

---

# **Untersuchung von Peptidomimetika als Inhibitoren für das Chemokin CXCL8**

**Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation  
von Kevin Brahm**

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Katja Schmitz  
Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Harald Kolmar

Darmstadt 2020

---

---

Tag der Einreichung: 16. Dezember 2019

Tag der mündlichen Prüfung: 20. April 2020

Brahm, Kevin : Untersuchung von Peptidomimetika als Inhibitoren für das Chemokin CXCL8  
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,  
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020  
Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International  
<https://creativecommons.org/licenses/>

---

# Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich habe noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Darmstadt, den 02. Mai 2020

---

(Kevin Brahm, M. Sc.)

---


## Erklärung der Übereinstimmung

Ich erkläre hiermit, dass diese zweite elektronische Version der Doktorarbeit mit der zur Veröffentlichung freigegebenen Version übereinstimmt.

Darmstadt, den 02. Mai 2020

---

(Kevin Brahm, M. Sc.)



---

*„The circle is now complete. When I left you, I was but the learner; now I am the master.”*

**-Darth Vader-**



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>2</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>6</b>
2.1. Chemokine .....	6
2.1.1. CXCL8 .....	7
2.1.2. Rekrutierung von Leukozyten und Zellmigration .....	12
2.2. Inhibition von Chemokinen .....	14
2.2.1. Chemokine und ihre Rolle bei Krankheiten.....	14
2.2.2. Chemokininhibitoren.....	16
2.2.3. Strategien zur Inhibitorentwicklung .....	18
2.3. Peptidomimetika und Peptide .....	20
2.3.1. Inhibitorische Peptidomimetika .....	23
2.3.2. Synthetische kombinatorische Bibliotheken von Peptiden und Peptidomimetika .....	24
<b>3 Zielsetzung.....</b>	<b>28</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>29</b>
4.1. Chemokin-Expression und -Charakterisierung .....	29
4.2. Rationales Design von CXCL8 bindenden Peptidomimetika.....	34
4.2.1. Einfluss der Struktur von IL8RPLoops auf die Bindung mit CXCL8 .....	41
4.2.2. Interaktionen zyklisierter IL8RPLoops-Varianten mit CXCL8.....	48
4.2.3. Proteasestabilität von IL8RP-CycLoops.....	55
4.3. Screening von <i>One-Bead-One-Compound</i> Bibliotheken.....	57
4.3.1. Visuelles Screening durch 2-Kanal-Fluoreszenzmikroskopie.....	60
4.3.2. Magnetseparations-Screening .....	67
4.4. Zyklische Peptide als CXCL8 Liganden .....	79
4.4.1. Peptoid Synthese und Analyse .....	80
4.4.2. Affinität von CXCL-8 bindenden Peptoiden nach Zyklisierung.....	84
<b>5 Fazit und Ausblick</b>	<b>91</b>
5.1. Rationales Design von CXCL8 bindenden Peptidomimetika.....	91
5.2. Screening von Substanzbibliotheken .....	93
5.3. Zyklische Peptomere als CXCL8 Inhibitoren.....	96

<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>98</b>
6.1.	Chemikalien und Materialien .....	98
6.1.1.	Puffer und Lösungen .....	98
6.1.2.	Antikörper und Proteine.....	100
6.1.3.	Synthescharze und Partikel.....	100
6.2.	Geräte und Software .....	101
6.3.	Proteinchemische Methoden .....	104
6.3.1.	Proteinexpression.....	104
6.3.2.	Proteinreinigung.....	104
6.4.	Synthese kleiner Moleküle .....	105
6.4.1.	Analyse- und Charakterisierungsmethoden.....	105
6.4.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	107
6.4.3.	Synthese von Linker-Molekülen und Markern.....	111
6.4.4.	Synthese geschützter primärer Amine für die Peptidsynthese .....	113
6.4.5.	Proteinkonjugation.....	116
6.5.	Peptomersynthese .....	116
6.5.1.	Partikelfunktionalisierung.....	116
6.5.2.	Festphasen-Peptid- und Peptidsynthese.....	118
6.5.3.	Proteasestabilität von Peptiden.....	136
6.5.4.	Mix-and-Split Synthese .....	137
6.6.	Screening von Substanzbibliotheken .....	139
6.6.1.	2-Kanal Fluoreszenzmikroskopie .....	139
6.6.2.	Magnetseparation.....	139
6.7.	MD Simulationen .....	142
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>170</b>
8.1.	Chemokinexpression und -Charakterisierung.....	170
8.2.	Bindungsaffinität von CXCR1-p1 Mutanten (vgl. Kapitel 4.2.1) .....	171
8.3.	Semiquantitative Bestimmung der Proteasestabilität zyklisierter Peptide .....	175
8.4.	Bindungsaffinität zyklisierter Peptide (vgl. Kapitel 4.4.2) .....	177
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>185</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>187</b>



---

# Danksagung

Eine Arbeit dieser Art ist natürlich ohne die Unterstützung anderer Menschen nicht möglich, also werde ich an dieser Stelle versuchen meinen aufrichtigen Dank an alle auszusprechen, die mir durch fachlichen und persönlichen Rat bei der Erstellung dieser Dissertation geholfen haben.

Zu aller erst möchte ich natürlich Frau Prof. Katja Schmitz danken, die mich so herzlich in ihren Arbeitskreis aufgenommen hat und mir ermöglicht hat meinen Weg einzuschlagen. Ich danke dir für die ausgezeichnete Betreuung während der letzten Jahre und vor allem die letzte Zeit, für die guten Ideen und den Beistand bei diesem interessanten Forschungsthema und vor allem danke ich dir für das ansteckende Interesse, das mich immer wieder nach vorn hat blicken lassen.

Herrn Prof. Kolmar danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und der Bereitstellung einiger Gerätschaften seines Arbeitskreises, die die Arbeit erheblich erleichtern konnten.

Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter des AK Kolmar, Dr. Olga Avrutina und Dana Schmidt, die mir bei der Peptidsynthese mit Rat und Tat unter die Arme gegriffen haben. Hendrik Schneider, Dr. Christina Uth, Dr. Sascha Knauer und Dr. Sebastian Hörner danke ich dafür, dass ihnen keine meiner MS-Proben zu viel war. Ich danke Dr. Doreen Könning, Julius Grzeschik, Dr. Stefan Dickgießer, Dr. Stefan Zielonka und vor allem „Frau“ Dr. Bernhard Valldorf für den Kaffee und für den Platz auf der Bürocouch und dem Rest des AKs, dass ein Immigrant immer bei ihnen willkommen war.

Dr. Sven Jager und Philipp Babel aus der Hamacher AG danke ich für die Simulationen und die Hilfe bei deren Auswertung. Ich kann eure Arbeit nicht ohne das Wort „Magie“ erklären! Philipp Czechowski danke ich für die Messung der CD Spektren.

Mein besonderer Dank geht an Julia Wack, die sowohl als Praktikantin, Masterandin und als Kollegin die Niederlagen und Erfolge dieser Arbeit geteilt hat und wohl besser als alle anderen versteht wie schwer das Licht am Ende des Tunnels zu sehen ist. Du bist wesentlich an dem ganzen Kram hier mitbeteiligt und ich weiß, dass du das auch bald geschafft hast! Dr. Ina Rink bekommt ebenfalls ein größeres Stück Dank von mir ab. Du warst das Öl im Getriebe des AKs und ich kann mir nicht vorstellen wie es ohne dich gelaufen wäre. Bei Anke Imrich bedanke ich mich recht herzlich für das ganze IL-8, die Pflege der Zellen und den Ruhepol im AK. Rock on! Bei Victoria Engemann und Stefanie Eckes bedanke ich mich für die Hilfe mit den ganzen Assays und vor allem für die Action bei allen Pubquiz/Karaoke/Spieleabend-Aktionen, die mit euch gelaufen sind. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Dorothea ‘Loops-Queen‘ Helmer und Dr. Marina Jöst für die Vorarbeit und die alten Zeiten.

Ich danke außerdem in keiner bestimmten Reihenfolge meinen Freunden Lukas, Dr. Glogarin, Dr. Roxor, David, Fischli, Dr. Graf, Dr. Jenny, Meike, Lauri, Dr. König Koenig, Yannick, Dasha, Kadda, Christoph, Mona, Captain Morgan und besonders Markus, Eric, Heiko und Jens für alle verrückten Parties, dummen Sprüche, gefährlichen Aktionen, zensiert durch den Editor, kindischen Humor, neue Hobbies, einzigartigen Roadtrips und alle anderen besonderen Momente, die ich mit euch teilen konnte. Ohne euch wäre ich verrückt geworden... oder zumindest habt ihr meinen Wahnsinn auf einem sozialgesellschaftlich

---

(beinahe) akzeptablen Level gehalten. Ein großes Danke auch dir Joris! Ich hab immer noch keine Ahnung wie du aus ein paar Strichen solche Kunstwerke schaffen kannst.

Auch danke ich der YMC Europe und insbesondere Frau Dr. Friederike Becker und Herrn Dr. Harald Mayer, die mir die nötige Flexibilität im Endspurt der Arbeit eingeräumt haben.

An dieser Stelle danke ich noch dir, Chrizz. Für die Zeit vor, während und nach der WG und dafür, dass du immer den Überblick über die wichtigen Dinge hattest. Du hast keine Ahnung wie sehr du mir geholfen hast. Was plätschert hier denn so?

Zu guter Letzt geht mein größter Dank an meine Großeltern und vor allem an meinen Vater. Es werden nie Worte dafür existieren wie dankbar ich für die jahrelange Unterstützung bin. Ich wäre nie so weit gekommen, wenn ich mich nicht immer auf euch verlassen könnte. Danke für die Rückendeckung!

---

# 1 Zusammenfassung

Als kleine Signalmoleküle des Immunsystems spielen Chemokine eine essentielle Rolle bei einer Vielzahl von chronisch entzündlichen Krankheiten und Autoimmunerkrankungen. Die Inhibition der Wechselwirkung dieser Moleküle mit ihren korrespondierenden Rezeptoren ist daher eine wichtige Strategie in der Entwicklung neuer Pharmazeutika zur Therapie dieser Entzündungserkrankungen. Ein Ansatz zur Chemokininhibition sind Peptide, die von diesen Rezeptoren abgeleitet werden und damit die Protein-Rezeptor-Wechselwirkung nachahmen und inhibieren können.

In vorangegangenen Arbeiten wurde mit Hilfe von molekularem Modeling ein Peptid entwickelt, das einen Teil der Bindungsstelle des CXCL8 Rezeptors CXCR1 nachahmt. Dieses Peptid, IL8RPLoops, besteht aus zwei verknüpften Sequenzen aus der zweiten und dritten extrazellulären Schleife der Rezeptors, die ausreichend lang sind, um jeweils eine helikale Windung auszubilden. Es bindet mit submikromolarer Affinität an das Chemokin CXCL8. Wir vermuteten, dass die Vororientierung dieses Peptids in Lösung zu einer Rezeptor-ähnlichen Konformation für die relativ hohe Bindungsaffinität des linearen Peptids verantwortlich ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass am C-terminalen Ende des Peptids Glutaminsäure, statt Glutamin inkorporiert wurde und dieser durch Desamidierung hervorgerufene Austausch die Ausbildung sekundärer Strukturen des freien Peptids begünstigte.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher die Auswirkung bestimmter Sekundärstrukturelemente des aus CXCR1 abgeleiteten Peptids auf seine Affinität untersucht. Durch Austausch von helixbildenden Peptidbausteinen mit helixbrechenden Peptidbausteinen mit gleichen Seitenketten wurde deren Einfluss auf die Struktur des potentiell vororientierten IL8RPLoopsE Peptids untersucht und mit der Auswirkung analoger Austausche an einem unstrukturierten Peptid verglichen, das aus dem N-Terminus des gleichen Rezeptors abgeleitet wurde und damit den anderen Teil der Bindungsstelle nachahmt. Bei Varianten des von vornherein unstrukturierten Peptids führten die helixbrechenden Reste zu einer Abschwächung der Bindungsaffinität, während helixbrechende Reste des IL8RPLoops Peptids diese vollständig verloren. Im CD-Spektrum dieser Varianten waren keine  $\alpha$ -helikalen Anteile erkennbar.

Es wurden MD-Simulationen durchgeführt, um Voraussagen über die Vororientierung der IL8RPLoops Derivate zu treffen. Dabei zeigte sich, dass die Termini von IL8RPLoopsE im Vergleich zu IL8RPLoopsQ sehr nah beieinander liegen und über Wasserstoffbrücken miteinander wechselwirken, so dass ein nicht-kovalenter Zyklus in Lösung vorliegt. Um den Einfluss dieser zyklischen Konformation auf die Bindungseigenschaften der beiden Peptide zu untersuchen, wurden diese durch orthogonale *side-chain-to-tail* Makrozyklisierung modifiziert. Die kovalente Zyklisierung erhöhte die Affinität des bindenden, linearen Peptids nur leicht, während die vorher nicht-bindende Variante nach Zyklisierung nun fast die gleiche Affinität aufwies. Beide zyklisierten Peptide zeigten in Fluoreszenzanisotropie-Messungen eine hohe Anisotropie, die bei Bindung an CXCL8 sank. MD-Simulationen wiesen darauf hin, dass der Fluorophor, der an einem flexiblen Linker verknüpft war, mit dem Peptid-Makrozyklus interagierte und bei Bindung des Peptids an das Chemokin verdrängt wurde. Die daraus resultierende Beweglichkeit des Fluorophors führt zu niedriger Fluoreszenzanisotropie, ein Effekt der als „Propeller-Effekt“ bekannt ist. Die Makrozyklisierung der Peptide hatte außerdem im Vergleich zu den linearen Varianten eine Erhöhung der Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau zur Folge.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Peptidomimetika aus kombinatorischen Bibliotheken identifiziert und weiterentwickelt werden. Die Mix-and-Split Synthese ist eine Strategie, um schnell und einfach eine große und diverse Anzahl von Substanzen zu synthetisieren, die bindende und inhibierende Eigenschaften

---

gegenüber einem Zielprotein aufweisen können. Das Screening einer solchen *One-bead-one-compound* (OBOC) Bibliothek ist nicht trivial und häufig mit kostspieligen Strategien und Gerätschaften verbunden. Es wurden daher in dieser Arbeit eine Methode, basierend auf zwei-Kanal-Fluoreszenzmikroskopie und eine Methode basierend auf modifizierten Magnetpartikeln validiert, die ein einfaches und kostengünstiges Screening dieser Substanzbibliotheken ermöglichen können. Zur Methodenentwicklung wurde eine Auswahl an Streptavidin bindenden Peptiden auf TentaGel-HMBA-Syntheseharzsynthetisiert und am Harz entschützt. Diese Peptide deckten ein weites Spektrum von Bindungsaffinitäten, als auch andere physikochemische Eigenschaften, wie Nettoladung und Länge der bindenden Sequenz, ab, um eine Aussage über die Anwendbarkeit und Mindestaffinität für die Detektion beider Verfahren treffen zu können. Im fluoreszenzbasierten Verfahren wurden diese Peptide mit fluoreszent-markiertem Streptavidin inkubiert und mit kurzer Belichtungszeit im RHO und FITC-Kanal des Fluoreszenzmikroskops fotografiert, um das Photobleaching zu minimieren. Sekundäre Wechselwirkungen durch elektrostatische Interaktion der mit Peptiden funktionalisierten Partikel und des fluoreszenzmarkierten Proteins wurden durch Variation des Farbstoffs und Kontrollpartikel ausgeschlossen. Die resultierende Methode ist dafür geeignet, kurze Sequenzen, die im niedrigen mikromolaren Bereich an das Zielprotein binden, zu identifizieren. Sie wurde in nachfolgenden Arbeiten dafür verwendet eine Bibliothek von linearen Peptoid-Hexameren erfolgreich gegen CXCL8 zu screenen und im Anschluss daran 17 Hits zu identifizieren und zu charakterisieren. Im Magnetpartikel-basierten Verfahren wurde die gleiche Auswahl von immobilisierten Peptiden mit Streptavidin-beschichteten Magnetpartikeln behandelt, wobei die Partikel der Biotin-Positivkontrolle und der am stärksten bindende Sequenz ausreichend mit Magnetpartikeln beladen werden konnten, um im Magnetfeld eines Handmagneten mobilisiert zu werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Streptavidin-Magnetpartikel mit biotinyliertem CXCL8 beladen und anschließend zur Abtrennung von CXCR1 transfizierte HEK293-Zellen aus einer Suspension und neutrophilen Granulozyten aus Vollblut verwendet werden können. Schließlich wurde eine OBOC-Bibliothek aus 100 000 verschiedenen makrozyklisierten pentameren Peptoiden synthetisiert und mit Hilfe des magnetpartikelbasierten Verfahrens 22 CXCL8 bindende Partikel aus dieser isoliert. Die Sequenzierung und Charakterisierung dieser Liganden ist Bestandteil nachfolgender Arbeiten.

Da die Makrozyklisierung in dieser Arbeit bereits bei CXCL8 bindenden Peptiden zu einer Erhöhung der konformationellen Rigidität und Bindungsaffinität geführt hatte, wurde diese Strategie auch auf die linearen Hexapaptoide aus dem Screening mit 2-Kanal Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Es wurde eine *on-bead* Makrozyklisierung und Fluoreszenzmarkierung dieser 17 Peptoide über zwei zusätzlich am C-Terminus eingeführte orthogonal geschützte Lysinreste durchgeführt. Die resultierenden TAMRA-markierten makrozyklischen Peptomere zeigten ebenfalls den oben beschriebenen „Propeller-Effekt“, und es konnte eine Erhöhung der Bindungsaffinitäten zu CXCL8 um etwa eine Größenordnung im Vergleich zu den entsprechenden linearen Sequenzen nachgewiesen werden.

---

## 2 Einleitung

Die Hauptaufgabe des Proteins CXCL8 (Interleukin-8) im Organismus ist die Rekrutierung von Leukozyten in erkranktem und entzündetem Gewebe. Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Peptiden und Peptidomimetika, die an das Chemokin CXCL8 binden und somit dessen biologische Aktivität inhibieren könnten. Einführend hierzu gibt Kapitel 2.1 einen generellen Überblick über die Substanzklasse der Chemokine, wobei Kapitel 2.1.1 näher auf die strukturellen und biologischen Eigenschaften von CXCL8 eingeht. Die durch CXCL8 ausgelösten biologischen und biochemischen Vorgänge bei der Rekrutierung, Migration und Extravasation von Leukozyten werden in Kapitel 2.1.2 beschrieben. Durch das Mitwirken dieser Moleküle bei verschiedenen chronischen Krankheiten und der Metastase von Krebszellen, besteht ein großes Interesse an der Inhibition dieser Vorgänge durch verschiedene Pharmazeutika. Kapitel 2.2 geht auf die Inhibition von Chemokinen ein, wobei Kapitel 2.2.1 den Zusammenhang von Chemokinen mit einigen Krankheiten aufzeigt und Kapitel 2.2.2 verschiedene Klassen von Chemokininhibitoren beschreibt. Einige Peptidomimetika wie Peptide besitzen Vorteile gegenüber Peptiden, wie die bessere Bioverfügbarkeit und Stabilität gegen Proteasen. Durch die hohe strukturelle Ähnlichkeit von Peptiden zu Peptiden haben diese eine ähnliche synthetische Zugänglichkeit und biologische Aktivität. Bekannte inhibitorisch wirkende Peptidomimetika werden in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Die verschiedenen Herangehensweisen zur Generierung von peptidischen und peptidomimetischen Substanzbibliotheken, sowie deren Analyse und Screening wird in Kapitel 2.3.2 erläutert.

---

### 2.1. Chemokine

---

Das menschliche Immunsystem dient der Verteidigung des Körpers gegen Fremdkörper jeglicher Art und Pathogene, wie Bakterien oder Viren. Es wird in zwei Teilsysteme unterteilt, die man das adaptive oder spezifische Immunsystem und das angeborene oder unspezifische Immunsystem nennt. Weiße Blutkörperchen (Leukozyten) sind ein Überbegriff für verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems, wobei neutrophile Granulozyten den Großteil dieser Leukozyten ausmachen und für die erste Immunantwort an Entzündungsherden verantwortlich sind.<sup>[6]</sup> Zur Erkennung und Inaktivierung von Pathogenen müssen die Leukozyten zunächst aus dem Blutkreislauf zum Entzündungsherd gelangen. Dieser Prozess der gerichteten Migration wird durch die Proteinklasse der chemotaktischen Zytokine oder Chemokine gesteuert und reguliert.<sup>[7-15]</sup> Nach Stimulation von Muskelzellen, Epithelzellen, Endothelzellen oder verschiedenen Blutzellen, wie den Leukozyten selbst, durch ein Pathogen oder proinflammatorische Zytokine wird die Sekretion von Chemokinen eingeleitet.<sup>[16-21]</sup> Diese kleinen Proteine mit einer Größe von 8-12 kDa sind essentiell für die Entwicklung und Kontrolle des Immunsystems durch Steuerung und Koordination der Leukozytenbewegung und spielen sowohl eine Rolle in der Embryonalentwicklung als auch bei Heilungsprozessen.<sup>[13, 22-23]</sup> Sie besitzen eine hoch konservierte Tertiärstruktur trotz einer sehr variablen Sequenzhomologie von 20-90%.<sup>[24]</sup> Generell wird die Tertiärstruktur von Chemokinen durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert. Der ungeordnete N-Terminus geht in ein dreisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt über, welches C-terminal in einer  $\alpha$ -Helix ausläuft.<sup>[25]</sup> Chemokine werden in 4 Unterklassen unterteilt, die nach der Anordnung der N-terminalen Cysteine in der Aminosäuresequenz benannt sind: CL, CCL, CXCL und CX<sub>3</sub>CL. In dieser Nomenklatur wird die Abfolge der N-terminalen Cysteine (C) und beliebiger Aminosäuren (X) dargestellt, wobei L für Ligand steht.<sup>[26]</sup> Die CXC-Chemokine sind in zwei weitere Klassen

---

unterteilbar. Bei ELR<sup>+</sup>CXC-Chemokinen geht der CXC-Sequenz das sogenannte „ELR-Motiv“ voraus, welches aus der Sequenz Glutamat, Leucin und Arginin besteht. Diese Chemokine zeigen angiogene Aktivität, während bei ELR<sup>-</sup>CXC-Chemokinen dieses Motiv fehlt und eine angiostatische Aktivität resultiert.<sup>[24, 27]</sup> Die hauptsächlichen Bindungspartner für Chemokine sind einerseits Glykosaminoglykane (GAGs) auf der Zelloberfläche, die aufgrund ihrer negativen Ladung unter physiologischen Bedingungen mit den positiv geladenen Chemokinen, insbesondere der C-terminalen GAG-Bindestelle, interagieren.<sup>[28]</sup> Andererseits sind die für die Aktivierung der Leukozyten entscheidenden Bindungspartner G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die auf der Zelloberfläche von Endothelzellen und Leukozyten vorkommen. Diese Membranproteine besitzen einen extrazellulären ungeordneten N-Terminus und sieben Transmembranhelices, die in einem intrazellulären C-Terminus enden, und weisen eine Sequenzhomologie von bis zu 80% auf.<sup>[24, 26, 29]</sup> Die Nomenklatur dieser Chemokinrezeptoren wird analog zu der der zugehörigen Chemokine durchgeführt mit der Endung R (Rezeptor) statt L (Ligand).<sup>[26]</sup> In einem Zweischnittmechanismus bindet das positiv geladene Chemokin zunächst durch elektrostatische Wechselwirkungen an den Rezeptor-N-Terminus. Die Rezeptoraktivierung findet darauf folgend durch Bindung der extrazellulären Domänen des GPCRs mit dem Chemokin-N-Terminus statt.<sup>[30]</sup> Dies führt zu Signalkaskaden und zur Aktivierung der Migration der Zellen durch Aktinpolymerisation und Integrin-Aktivierung oder zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), sowie Degranulierung und Freisetzung verschiedener Enzyme.<sup>[31]</sup> Etwa 50 Chemokine und 22 Chemokinrezeptoren wurden bisher im Menschen entdeckt und charakterisiert.<sup>[24, 32]</sup>

---

### 2.1.1. CXCL8

---

Das ELR<sup>+</sup>CXC Chemokin CXCL8 oder Interleukin-8 (IL8) ist eines der am besten untersuchten Chemokine. Es besitzt die höchste spezifische Aktivität gegenüber neutrophilen Granulozyten und wurde erstmals im Jahr 1987 beschrieben.<sup>[33-36]</sup> Eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen wie zum Beispiel Endothelzellen, Epithelzellen, Monozyten, Fibroblasten, neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NKC) und T-Zellen können CXCL8 nach Aktivierung als inaktive 99 Aminosäure lange Vorstufe exprimieren.<sup>[35, 37-38]</sup> Nach Abspaltung einer Signalsequenz treten verschiedene Isoformen von CXCL8 mit unterschiedlicher Sequenzlänge auf, von denen die aktivste die 72 Aminosäure lange Isoform ist, die nach Bildung der Disulfidbrücken eine Masse von 8386 Da besitzt.<sup>[33, 35, 39]</sup> Diese Isoform hat einen pI von 8.3 und ist damit, wie ein Großteil der Proteine aus der Chemokinfamilie, bei physiologischem pH positiv geladen.<sup>[37]</sup> Sie ist in einem weiten Temperatur- und pH-Bereich stabil, wird aber leicht durch Reduktionsmittel inaktiviert.<sup>[37]</sup> In nativer Form liegt CXCL8 als Homodimer mit einer Dimerisierungskonstante zwischen 0.1  $\mu\text{M}$ <sup>[40]</sup> und 20  $\mu\text{M}$ <sup>[41-42]</sup> vor, wobei es widersprüchliche Befunde gibt, welche der Varianten die aktive Form des Chemokins darstellt.<sup>[43-44]</sup> Jedes Monomer besteht aus einem flexiblen N-Terminus, der hinter dem CXC-Motiv zunächst über die N-Schleife und eine  $3_{10}$ -Helix in ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, bestehend aus drei  $\beta$ -Strängen, übergeht. Die Stränge  $\beta_1$  und  $\beta_2$  sind über die 30S-Schleife und die Stränge  $\beta_2$  und  $\beta_3$  über die 40S-Schleife miteinander verknüpft (siehe Abbildung 2.1).



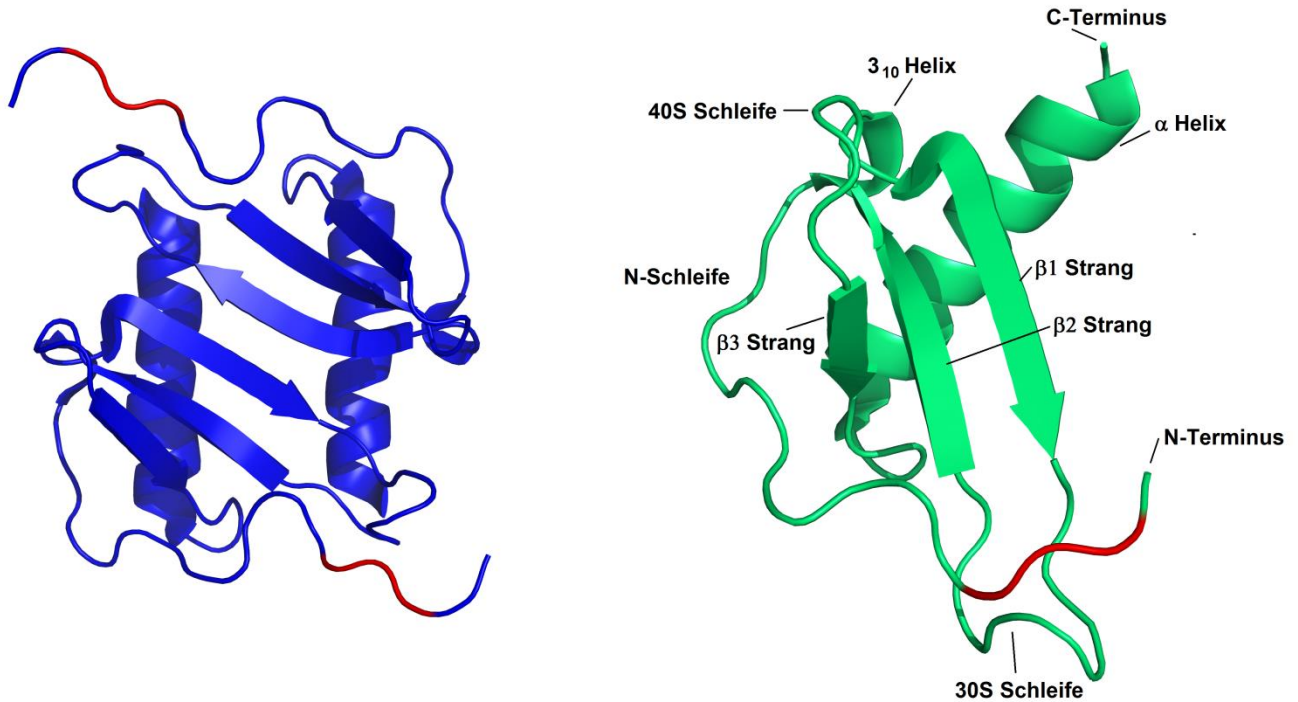


Abbildung 2.1: Links: CXCL8 Dimer (pdb ID 1IL8, N-terminales Ser1 nicht in Sequenz enthalten) aus NMR Daten<sup>[4]</sup>. Rechts: CXCL8 Monomer (pdb ID 5D14, N-terminales Ser1 und Ala2 nicht in Sequenz enthalten) aus Röntgenstrukturanalysen (Brzezinski et al. – unpubliziert). Das ELR-Motiv ist rot hervorgehoben.

In Studien wurde sowohl für die monomere, als auch die dimere Variante eine Aktivität hinsichtlich der Rekrutierung von Neutrophilen festgestellt.<sup>[45-46]</sup> Allerdings wird aufgrund der größeren Bindungskonstanten vermutet, dass die Dimerisierung der negativen Regulierung des Aktivierungsvorgangs dient und somit das Monomer die aktive Form von CXCL8 darstellt.<sup>[40, 42, 47-49]</sup>

Der C-Terminus endet in einer  $\alpha$ -Helix. Es werden zwei Disulfidbrücken zwischen Cys7/Cys34 und Cys9/Cys50 ausgebildet, die den N-Terminus mit der 30S Schleife, respektive dem  $\beta_3$  Strang verknüpfen. Die Dimerisierung findet jeweils über die  $\beta_1$  Stränge der  $\beta$ -Faltblätter statt, dabei interagieren die Reste Lys23 und Glu29 auf entgegengesetzten Monomeren miteinander. Beide Arginine Arg26 stehen sich direkt gegenüber und werden von den benachbarten Glutamatresten Glu24 neutralisiert. Dadurch entsteht eine Art Quadrupol in dem jede Aminosäure von zwei entgegengesetzt geladenen umgeben ist. Auf der anderen Seite des  $\beta$ -Faltblatts stehen sich Val27 und Leu25 jeweils genau gegenüber und es entsteht ein stabiles sechssträngiges  $\beta$ -Faltblatt (Abbildung 2.2).<sup>[4, 50-51]</sup>

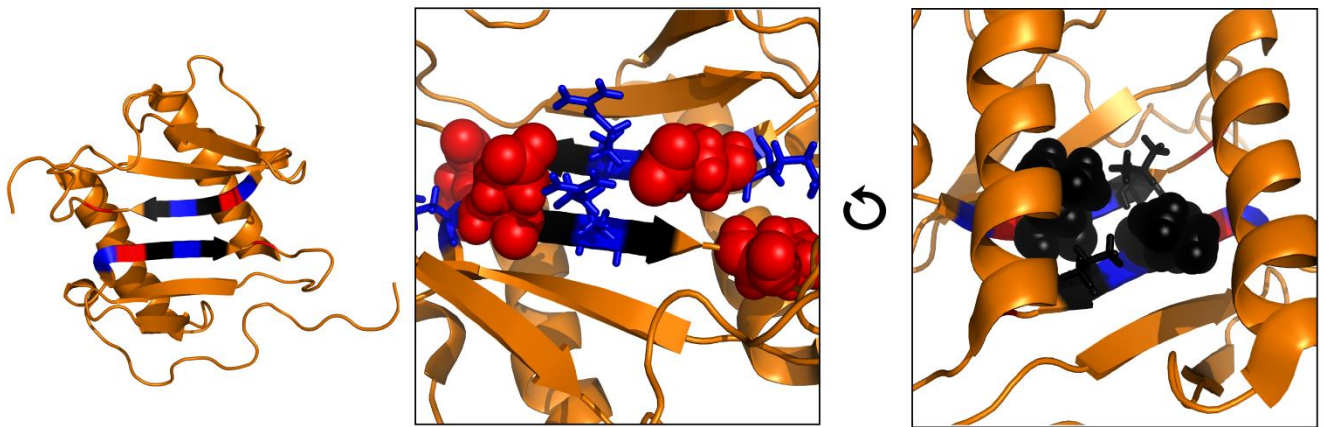


Abbildung 2.2: CXCL8 Dimer (pdb ID 1IL8, N-terminales Ser1 nicht in Sequenz enthalten) aus NMR Daten<sup>[4]</sup>. Kontaktfläche beider Monomere farblich hervorgehoben (blau: kationische Reste Lys23/Arg26, rot: anionische Reste Glu24/Glu29, schwarz: hydrophobe Reste Leu25/Val27). Die Kationischen Reste und Val27 sind zur besseren Visualisierung als Stabstruktur dargestellt.

CXCL8 bindet an zwei verschiedene Chemokinrezeptoren mit einer Affinität im unteren nanomolaren Bereich: CXCR1 und CXCR2.<sup>[52-54]</sup> Diese Rezeptoren befinden sich beispielsweise auf der Zelloberfläche von Basophilen, Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten und Endothelzellen, sowie verschiedenen Krebszellen.<sup>[37, 55]</sup> Diese beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) sind zu 77 % sequenzhomolog und können durch Bindung von CXCL8 mehrere Signalkaskaden auslösen.<sup>[52-53, 56-57]</sup> CXCR2 ist der dominierende Rezeptor auf der Oberfläche von Monozyten, Basophilen und Eosinophilen und wird neben CXCL8 von einer Vielzahl anderer CXC-Chemokine wie CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 und CXCL6 aktiviert.<sup>[14, 24, 58-59]</sup> Neutrophile präsentieren sowohl CXCR2 als auch den für CXCL8 und CXCL6 spezifischen Rezeptor CXCR1 in gleicher Anzahl, wodurch vermutlich die hohe Aktivierungsspezifität dieser Zellen gegenüber CXCL8 resultiert.<sup>[60-61]</sup> Der Einfluss des Monomer-Dimer Gleichgewichts von CXCL8 auf dessen Bindung mit CXCR1 wurde genauer mithilfe von „Monomervarianten“ untersucht, in den verschiedene Mutationen an der Dimerisierungsstelle des Chemokins eingeführt wurden. Die Mutanten E24L/L25E, L25F/V27F und V27A zeigten dabei eine Dimerisierungskonstante von 7 mM, wohingegen L25Y/V27R noch bei einer Konzentration von 10 mM als Monomer vorlag.<sup>[62-64]</sup> Das Einführen einer Methyl-Gruppe in das Proteinrückgrat führte zum Verlust der  $\alpha$ -helikalen Struktur der Reste 67-72 und zu der Monomervariante L25Me mit einer Affinität zu CXCR1 von  $K_d = 0.8 \pm 0.3$  nM.<sup>[49, 65]</sup> Dies entspricht der Affinität des CXCL8 Wildtyps, und es wurde daraus geschlossen, dass die C-terminale Helix lediglich in der dimeren Struktur vollständig stabil ist.<sup>[66]</sup> Durch Deletion der entsprechenden Aminosäuren 67-72 wurde eine weitere Variante generiert und durch NMR- und CD-Spektroskopie als Monomer charakterisiert.<sup>[67-68]</sup> Eine reine Dimervariante wurde durch die Mutation R26C generiert, bei der die Dimere kovalent durch Bildung einer Disulfidbrücke gebildet werden. Sie zeigte eine Affinität zu CXCR1 von  $K_d = 55.0$  nM.<sup>[65]</sup>

Neben den Untersuchungen des Einflusses des Monomer-Dimer-Gleichgewichts auf die Bindung von CXCL8 an CXCR1 wurden zahlreiche Studien zur Interaktion dieser Bindungspartner durchgeführt. Frühe Studien an der Deletionsvariante CXCL8(6-72) zeigten, dass das ELR-Motiv essentiell für die Rezeptorbindung und -aktivierung ist.<sup>[69-70]</sup> Durch Punktmutationen von CXCR1 konnte gezeigt werden, dass die in den extrazellulären Domänen ECD3 und ECD4 liegenden Reste R199, R203, E275 und R280 durch mögliche Interaktionen mit dem ELR-Motiv an der Bindung mit CXCL8 beteiligt sind.<sup>[71-72]</sup> Ebenso wurde der Rezeptor-N-Terminus durch Untersuchung von CXCR1/2 Chimären als mögliche Bindungsstelle identifiziert, die für die Chemokinspezifität verantwortlich ist.<sup>[73]</sup> Darauf folgende NMR-Studien mit <sup>15</sup>N-markiertem CXCL8



---

ließen auf verschiedene Interaktionsstellen mit den extrazellulären Domänen von CXCR1 und einem N-terminalen Peptid CXCR1(1-40) schließen. Dabei zeigten die N-Schleife, 3<sub>10</sub>-Helix, 40S-Schleife und der  $\beta_3$ -Strang, sowie die  $\alpha$ -Helix mögliche Interaktionsstellen, wobei die  $\alpha$ -Helix durch Untersuchung verkürzter CXCL8 Varianten CXCL8(1-51) und CXCL8(1-66) als Rezeptorbindungsstelle ausgeschlossen werden konnte.<sup>[69, 74-75]</sup> Diese Ergebnisse konnten in neueren NMR-Studien mit Teilen des CXCR1 Rezeptors in Lipidmembranen teilweise bestätigt werden. Hier konnten keine Interaktion zwischen den extrazellulären Schleifen des Rezeptors und dem ELR-Motiv des Chemokins nachgewiesen werden.<sup>[48, 74]</sup> Es wurde ein Bindungsmechanismus zwischen CXCL8 und CXCR1, bestehend aus zwei Schritten und mit zwei verschiedenen Bindungsstellen, postuliert. Im ersten Schritt interagieren der CXCR1 N-Terminus und die CXCL8 N-Schleife miteinander. Darauf folgend wird der CXCL8-N-Terminus den extrazellulären Schleifen des Rezeptors zur Interaktion des ELR-Motivs mit den Domänen ECD3 und ECD4 präsentiert.<sup>[76-78]</sup> Das Binden des Chemokin-N-Terminus an CXCR1 induziert dabei die Rezeptoraktivierung (Abbildung 2.3).<sup>[30]</sup>

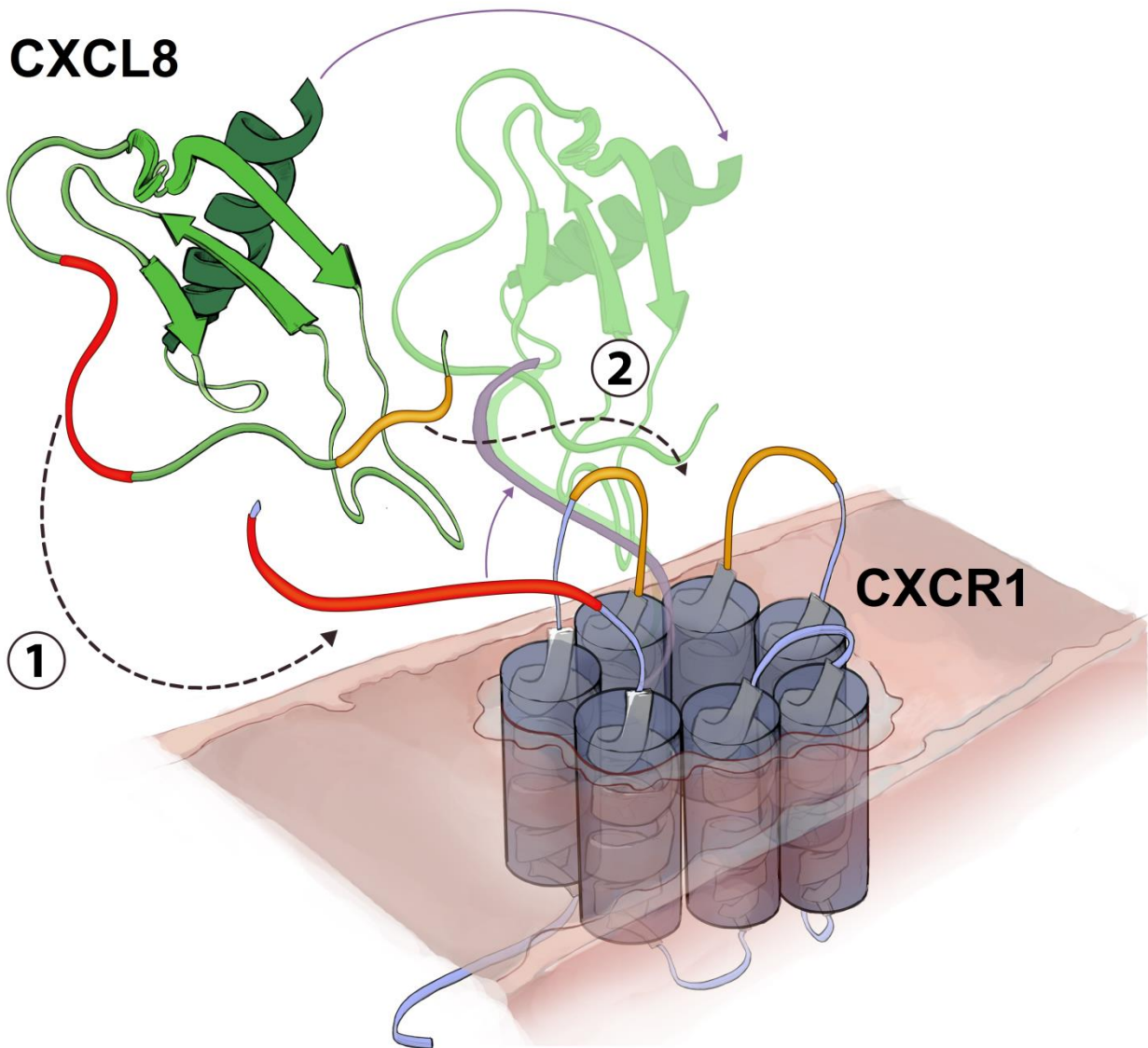


Abbildung 2.3: Zweistufiger Mechanismus der Bindung von CXCL8 an CXCR1.

- 1: Interaktion der CXCL8 N-Schleife mit dem CXCR1 N-Terminus (Interaktionsstellen „site I“ rot hervorgehoben).
- 2: Konformationsänderung des CXCR1 N-Terminus und Präsentation des CXCL8 N-Terminus an ECD 2 und ECD 3 von CXCR1 (Konformationsänderung mit lila Pfeilen verdeutlicht, Interaktionsstellen „site II“ in orange hervorgehoben).

1

Durch Konjugation des N-Terminus und der Domäne ECD4 von CXCR1 an ein lösliches Proteingerüst, konnte die extrazelluläre Struktur des Rezeptors nachgebildet werden. Bei einem solchen CROSS-Protein (*chemokine receptor elements on soluble scaffold*) kann die native Struktur der Ligandbindungsstelle des Rezeptors nachgeahmt werden. Dabei zeigte sich eine Verstärkung der Bindungsaffinität des CXCR1 N-Terminus an CXCL8 durch Anfügen der ECD4-Schleife gegenüber der

<sup>1</sup> Design der Abbildung: Joris Drobka, Darmstadt

---

Affinität zum alleinstehenden N-Terminus. Während ECD4 des Rezeptors allein nicht an CXCL8 bindet, zeigte der lösliche Proteinkomplex eine Affinität von  $K_D = 0.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ .<sup>[79]</sup>

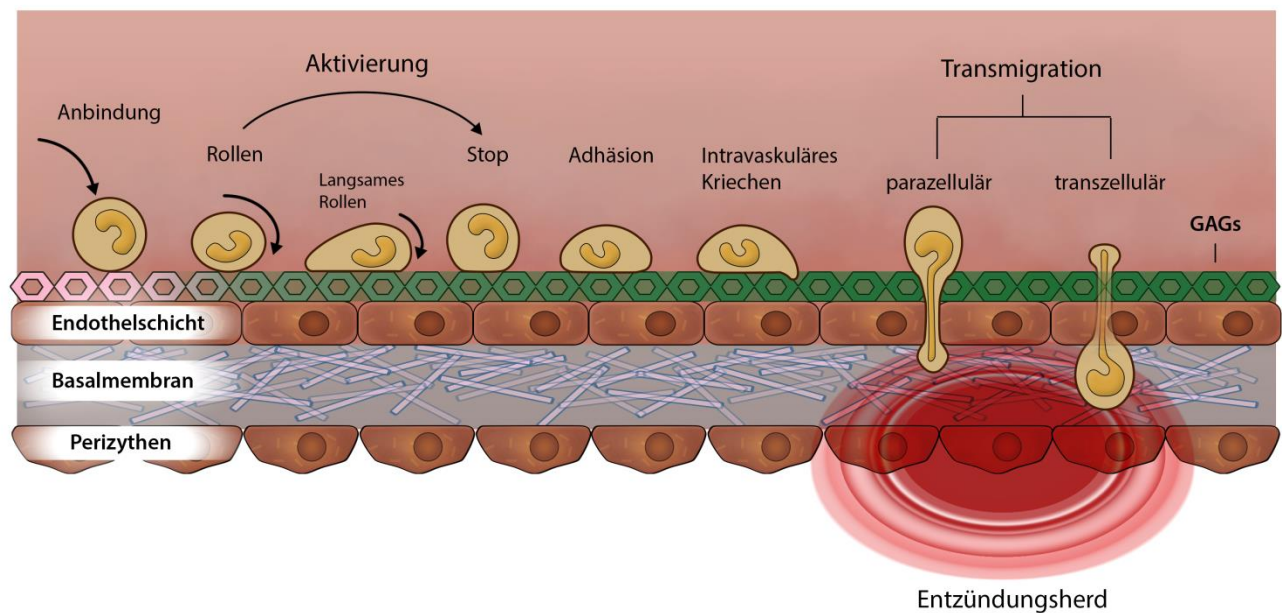
Eine weitere wichtige Eigenschaft von CXCL8 *in vivo* ist die Bindung an Glykosaminoglykane (GAGs), die auf der Oberfläche von Endothelialzellen präsentiert werden, um oberflächengebundene Chemokingradienten zu generieren.<sup>[80-83]</sup> Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass hydrophobe Interaktionen von N-acetylierten Resten in Heparansulfat, das im Organismus am häufigsten vorkommende GAG, für die spezifische Bindung an das Chemokin verantwortlich ist.<sup>[84]</sup> Die Bindung von CXCL8 an Heparin, ein weit verbreitetes und sehr gut untersuchtes Heparansulfat-Analogon, wird vor allem durch die basischen Aminosäuren R60, K64, K67 und R68 in der C-terminalen CXCL8  $\alpha$ -Helix gewährleistet.<sup>[80, 85-88]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der  $\alpha$ -Helix zum totalen Verlust der Bindungsaffinität führt und damit die Internalisierung von CXCL8 durch Endothelzellen und dessen Transzytose ausbleibt.<sup>[88]</sup> Interaktionen mit GAGs sind nicht auf Chemokine beschränkt, sondern werden bei einer Vielzahl von Proteinen beobachtet und hängen stark vom Abstand und Typ von basischen Aminosäuren in der Bindestelle des Proteins ab. Die Affinität beruht dabei hauptsächlich auf dem Verhältnis zwischen Arginin und Lysin an Positionen, die mit GAG-Anionen in Kontakt stehen.<sup>[84]</sup> Es wurden einige übereinstimmende Sequenzen für die GAG Bindung in verschiedenen Proteinen untersucht, die zum Beispiel in der Form XBBBXXBX dargestellt werden können, wobei B für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer basischen Aminosäure steht.<sup>[89]</sup> Diese Bindungssequenzen in Chemokinen sorgen für eine Immobilisierung des Chemokingradienten, der durch Diffusion im Blutstrom sonst schnell zerstört würde.<sup>[83, 90-91]</sup> Die Bindung zwischen Chemokin und GAG kann sich auf das Monomer/Dimer-Gleichgewicht des Chemokins auswirken. Es konnte gezeigt werden, dass durch diese Bindung eine Oligomerisierung von Chemokinen induziert wird.<sup>[25, 92]</sup>

---

### 2.1.2. Rekrutierung von Leukozyten und Zellmigration

---

Die Hauptaufgabe von Leukozyten im Organismus besteht darin, Pathogene zu erkennen und gezielt auszuschalten. Um an die entsprechenden Entzündungsherde zu gelangen, wandern Leukozyten auf oberflächengebundenen chemischen Gradienten, die u.a. von Chemokinen ausgebildet werden. Den Vorgang der gerichteten Migration entlang eines löslichen chemischen Gradienten nennt man Chemotaxis, während man bei oberflächengebundenen Gradienten von Haptotaxis spricht. Die Chemotaxis basiert auf einer Vielzahl zellulärer Prozesse, die durch lokalisierte Aktivierung von Rezeptoren durch Signalmoleküle auf der Zelloberfläche ausgelöst werden. Sie ist daher von vielen Variablen in der intrazellulären Signalweiterleitung abhängig.<sup>[93-94]</sup> Positive Chemotaxis bedeutet dabei, dass die Zelle in Richtung der höheren Chemokinkonzentration migriert. Im Blutstrom befindliche Leukozyten müssen, um den Entzündungsherd zu erreichen, aus dem Blutgefäß durch die Endothelschicht wandern. Bei diesem mehrstufigen Prozess, den man Extravasation nennt, spielen die Interaktionen von Endothelzellen und Leukozyten, die durch verschiedene Adhäsionsproteine und deren Liganden auf der Zelloberfläche vermittelt wird, eine wichtige Rolle.<sup>[95-97]</sup> Die Extravasation von Leukozyten ist dabei nicht nur von Chemokinen abhängig, auch Selektine und Integrine spielen eine wichtige Rolle. Die Extravasation wird in sechs Schritte unterteilt: Anbindung, Rollbewegung entlang der Zelloberfläche, Aktivierung, Adhäsion an die Zelloberfläche, Kriechbewegung und Transmigration durch die Endothelschicht (Abbildung 2.4).<sup>[94, 98-99]</sup>



<sup>2</sup>Abbildung 2.4: Extravasation von Leukozyten. Modifizierte Abbildung nach [98-99]. Die Anbindung der Leukozyten aus der Blutbahn an die Endothelschicht und die daraufhin folgende Rollbewegung wird durch Selektine vermittelt, die sowohl auf Leukozyten, als auch auf der Endothelschicht exprimiert werden. Durch Chemokine, die entweder löslich im Blutstrom oder auf GAGs immobilisiert (grüner Gradient) vorliegen, findet die Aktivierung der GPCRs der Leukozyten statt. Die darauffolgende Konformationsänderung von Integrinen und deren Bindung an ihre Liganden an der Endothelschicht unterstützt die Adhäsion der Zelle und führt zur Kriechbewegung. Die Transmigration wird von einer Vielzahl von Adhäsionsproteinen unterstützt.

Da die Bindung zwischen Selektinen auf dem Endothel und Glykoproteinen auf den Leukozyten reversibel ist, wird diese ständig gebrochen und neu gebildet, was eine Rollbewegung der Leukozyten mit dem Blutstrom auslöst.<sup>[98, 100-104]</sup> Diese Rollbewegung erleichtert das Erkennen von oberflächengebundenen Chemokingradienten. In Folge dessen kommt es zur Aktivierung der Leukozyten durch auf dem Endothel über GAG gebundene Chemokine oder proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).<sup>[83, 90-91, 105-107]</sup> Die Transmigration wird durch die niedrigen Anteile an extrazellulärer Matrix in den Bereichen der Basalmembran und Perizyten gefördert.<sup>[108-109]</sup>

Perizyten können dabei durch Sekretion von Chemokinen die Bewegung der Leukozyten verstärken und diese zum entzündeten Gewebe leiten.<sup>[110]</sup> Die Zellen erkennen dabei den Konzentrationsgradienten des Chemoattraktanten über die gesamte Zelllänge, was zu einer Veränderung des Zytoskeletts und dadurch zu einer Zellbewegung führt. Neutrophile können dabei über ihre Zelllänge von 10  $\mu\text{m}$ , in einem optimalen Gradienten, bis zu 1 % Unterschied in der Chemokinkonzentration detektieren.<sup>[93, 111]</sup>

<sup>2</sup> Design der Abbildung: Joris Droba, Darmstadt

---

## 2.2. Inhibition von Chemokinen

---

Chemokine und deren Rezeptoren sind nicht nur an der Bekämpfung von Krankheitserregern und an der Wundheilung beteiligt. Beispielsweise führt die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch Chemokine zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies und Proteasen, die nicht nur Pathogene eliminieren, sondern auch die Zellen des Wirtsorganismus schädigen können. Die geschädigten Zellen können daraufhin ihrerseits Chemokine ausschütten, was eine Überreaktion hervorrufen kann. Chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen wie Asthma, *Lupus erythematoses*, Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis können Folgen einer dieser Überreaktionen oder Fehlsteuerung des Immunsystems sein, an der bestimmte Chemokine beteiligt sind.<sup>[112-116]</sup> Es ist allerdings noch nicht in allen Fällen vollständig geklärt ob in dieser Korrelation die Chemokine die Ursache oder ein Symptom darstellen.

---

### 2.2.1. Chemokine und ihre Rolle bei Krankheiten

---

Der systemische *Lupus erythematoses* (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung, die alle Organe betreffen kann. Sie wird durch Autoantikörper-Autoantigen Komplexe hervorgerufen und durch Infiltration von verschiedenen Typen von Leukozyten in das Gewebe verstärkt.<sup>[117-119]</sup> In Experimenten am Gewebe von SLE Patienten wurde ein Zusammenhang zwischen signifikant erhöhter Expression und extrazellulärer Konzentrationen von CXCL10, CXCL12, CXCL13, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und CX<sub>3</sub>CL1 und einem fortschreitenden Krankheitsbild festgestellt.<sup>[120-132]</sup>

Es wird vermutet, dass Störungen in der Zelldifferenzierung, die durch abnormale Chemokinregulierung hervorgerufen werden, für einige Entzündungsreaktionen verantwortlich sein können. So wird angenommen, dass CCL2, CCL3 und CCL5 als Proliferationsfaktoren bei der Bildung von T-Zellen eine Rolle spielen und einen kritischen Faktor in der Entstehung von rheumatoider Arthritis (RA), einer weiteren Autoimmunerkrankung, darstellen.<sup>[112, 133-135]</sup> Bei dieser Krankheit findet eine beständige Rekrutierung von Makrophagen in die Synovialmembran der Gelenke statt, was zu anhaltenden Entzündungen und Knochenschädigung führt.<sup>[134]</sup> CXCL8 konnte in hohen Konzentrationen bei RA Patienten in Gelenkflüssigkeit, Gelenkgewebe und Serum nachgewiesen werden, wobei die Konzentration in betroffenen Gelenken signifikant höher war als in unbetroffenen.<sup>[136-139]</sup> Durch CXCL8-Infusion in unbetroffene Gelenke, kann sogar experimentell RA induziert werden.<sup>[140-141]</sup> Inhibition von CXCL8 oder des CXCL8-bindenden Rezeptors CXCR2 im Tiermodell verhinderte die Infiltration von Leukozyten in RA-erkrankte Gelenke und zeigte eine Verringerung der Symptome von akuter CXCL8- und IL1-induzierter RA, sowie chronischer antigen-induzierter RA.<sup>[142-146]</sup>

Da die Invasion von Leukozyten durch die Wand von Blutgefäßen stattfindet und dadurch ebenfalls das Risiko einer Entzündungsreaktion steigt, sind Chemokine auch an vaskulären und kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt wie z.B. an Verletzungen der Blutgefäße, Arteriosklerose, Bluthochdruck oder der ischämischen Herzkrankheit.<sup>[112, 147-155]</sup> So lässt sich beispielsweise bei Arteriosklerose in fibrosen Plaques eine deutlich höhere CXCL8 Konzentration nachweisen als in gesunden Endothelzellen.<sup>[156]</sup> Dies lässt sich auf Monozyten zurückführen, die in arteriosklerotischem Gewebe eine stark erhöhte CXCL8-Produktion aufweisen.<sup>[157]</sup> Die Angiogenese fördernden Eigenschaften von CXCL8 machen dieses Chemokin zu einem wichtigen Mediator in der humanen koronaren Arteriosklerose.<sup>[158]</sup> Im Fall von myokardialen



---

Reperfusionsschäden, die bei Ischämien auftreten, zeigt eine direkte Inhibition von CXCL8 einen signifikant verringerten Grad an Nekrose des beteiligten Gewebes.<sup>[159]</sup>

Neben den Blutgefäßen kommt es auch in einigen Organen zu erhöhten Verweilzeiten von Leukozyten. In der Leber, der Milz und besonders der Lunge ist die Konzentration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten bereits bei gesunden Menschen leicht erhöht.<sup>[31]</sup> Kommt es in der Lunge durch Allergene zu einer Entzündungsreaktion, kann dies durch Überproduktion von CCL11 und CCL24 zu schwerem Schaden der Atemwege, sowie zu Asthma und anderen Lungenerkrankungen führen.<sup>[160]</sup> Dies wurde in Mausexperimenten durch erhöhte Rekrutierung von Eosinophilen bestätigt, die in diesem Krankheitsbild aus hauptverantwortliche Immunzellen gelten.<sup>[161]</sup>

Die Rezeptoren von Chemokinen auf T-Zellen, spielen eine wichtige Rolle für den Replikationszyklus des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Dieses Virus infiziert Makrophagen wobei neben dem CD4-Rezeptor auch die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 eine Rolle als Corezeptoren spielen.<sup>[162-163]</sup> Es wurde neben einer Korrelation zwischen dem HI-Virustiter und der CCL2-Konzentration festgestellt, dass dieses Chemokin für die Passage von Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich ist und somit infizierten Makrophagen die Möglichkeit gibt, das zentrale Nervensystem anzugreifen.<sup>[164-165]</sup> Neben der HIV bedingten Demenz, die durch den resultierenden Hirnschaden entstehen kann, spielen Entzündungsreaktionen und damit Chemokine auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson und Alzheimer eine Rolle.<sup>[115, 152, 166]</sup>

Weitere Beispiele sind chronische Darmentzündungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa,<sup>[115, 167]</sup> Nierenerkrankungen wie Glomerulonephritis,<sup>[127, 168-170]</sup> und Lebererkrankungen wie Fibrosen und Hepatitis B.<sup>[171-172]</sup> Bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa konnten erhöhte CXCL8 Konzentrationen in Urin und Serum nachgewiesen werden, die mit der Schwere der Entzündung korrelierten und sich bei Remission der Erkrankung wieder normalisierten.<sup>[173-174]</sup> CXCL8 wird als entscheidender Chemoattraktant für Neutrophile bei diesen Entzündungskrankheiten betrachtet.<sup>[174]</sup> Bei Untersuchungen der Bauchspeicheldrüse von Diabetes Typ II Patienten wurden erhöhte CCL5, CCL8, CCL22, CXCL9, CXCL10 und CX<sub>3</sub>CL1 Konzentrationen gemessen.<sup>[152, 175]</sup> Generell ist die chemokingesteuerte Einwanderung von Leukozyten an vielen verschiedenen Organerkrankungen beteiligt.

Der Einfluss von ELR<sup>+</sup>CXC-Chemokinen auf die Angiogenese spielt außerdem eine große Rolle bei der Metastase und dem Wachstum von Krebszellen.<sup>[27, 58, 112, 116, 152]</sup> Da die schnell wachsenden Krebszellen einen erhöhten Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff haben, kann durch Ausschüttung dieser Chemokine das Wachstum von Blutgefäßen eingeleitet werden und so erst eine ausreichende Versorgung des Tumors und eine Metastasierung ermöglicht werden. Zu diesem Zweck können Krebszellen neben Wachstumsfaktoren auch Chemokinrezeptoren und Chemokine selbst exprimieren.<sup>[58, 152, 176-178]</sup> Die autokrine Sekretion des Chemokins CXCL8 wurde beispielsweise an Melanomzellen, Darmkrebszellen, Pankreaskrebs und Leberkrebs beobachtet.<sup>[179-182]</sup>

---

## 2.2.2. Chemokininhibitoren

---

Die Therapie von chronischen Krankheiten erfordert die Entwicklung von neuen Pharmazeutika. Die meisten pharmazeutischen Wirkstoffe greifen in die Interaktionen von Proteinen, wie Rezeptoren, Enzymen oder Proteinliganden ein, um Mechanismen, die zur Krankheit beitragen, zu unterbrechen. Diese Substanzen können zu einer Reihe verschiedener Stoffklassen gehören wie zum Beispiel kleinen organischen Molekülen, Nukleinsäuren, Proteinen, Peptiden oder Peptidomimetika, die ihre Wirkung durch das Binden an das Zielprotein entfalten.

Wegen der Beteiligung von Chemokinen an einer Vielzahl verschiedener Krankheiten (vgl. Kapitel 2.2.1) wurden in den letzten drei Jahrzehnten, verschiedene mit Chemokinen im Zusammenhang stehende Signalwege erforscht und Methoden entwickelt, um diese beeinflussen zu können. Die Identifizierung von CCR5 als ein essentieller Corezeptor für die Infektion von Zellen mit HIV-1 im Jahre 1996 verstärkte das Interesse an der Inhibition von Chemokinrezeptoren deutlich.<sup>[183-184]</sup> Jedoch wurde erst im Jahre 1998 von den ersten kleinen Molekülen als potente Antagonisten gegen CXCR2 und CCR1 berichtet.<sup>[185-186]</sup> Der von Pfizer entwickelte CCR5-Antagonist Maraviroc ist ein für die HIV-Therapie zugelassener Wirkstoff, der durch Binden die Konformation der extrazelluläre Schleife 2 (ECL2) des Rezeptors ändert und so die Interaktion mit dem viralen Glykoprotein gp120 inhibiert.<sup>[187-188]</sup>

In diesem komplexen System binden einige Chemokine an mehrere verschiedene Rezeptoren und erfüllen so unterschiedliche Funktionen. Es ist sehr schwierig, Signalwege der normalen Zellvorgänge von denen zu unterscheiden, die Entzündungsprozesse auslösen. Durch Inhibition verschiedener durch Chemokine ausgelösten intrazellulären Signale auf der Ebene der GPCRs konnten tiefere Einblicke in die Signalweiterleitung nach Aktivierung von CXCR- und CCR-GPCRs erlangt und Zusammenhänge zu verschiedenen Krankheiten aufgeklärt werden. Vor allem an CXCR1, CXCR4, CCR2, CCR5 in T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen wurden Chemokin-Signalwege eingehend studiert.<sup>[189-</sup>

<sup>191]</sup> Ein Eingriff in dieses komplexe System kann zum septischen Schock durch Überreaktion oder Infektionen infolge einer Unterdrückung des Immunsystems führen. Zahlreiche Inhibitorclassen wurden bereits gegen Chemokine eingesetzt: Antikörper und Antikörperderivate, modifizierte Chemokine, kleine Moleküle, chemokinbindende Proteine und Peptide. Die Inhibition kann dabei durch Störung der Wechselwirkung zwischen Chemokin und GAG, Chemokin und Rezeptor oder durch Eingriff in die Signalkaskade selbst z.B. durch Targeting der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) erfolgen.<sup>[91, 189, 192-202]</sup> Wo durch Bindung verschiedener Liganden am gleichen Rezeptor unterschiedliche Reaktionen ausgelöst werden, bietet es sich an, das Chemokin direkt zu inhibieren, statt den Rezeptor, um Wechselwirkungen anderer Liganden mit dem Rezeptor und die Signalweiterleitung weiterhin zu gewährleisten.<sup>[203]</sup>

Antikörper eignen sich besonders für die spezifische Bindung und Signalunterdrückung an einem Rezeptor oder Chemokin. So wurde bereits 1999 ein CXCL8 bindender monoklonaler Antikörper erfolgreich bei der Behandlung von Schuppenflechte eingesetzt und ist seit 2003 in China unter dem Namen *Abcream<sup>TM</sup>* als Arzneimittel zugelassen.<sup>3</sup> Eine humanisierte Variante dieses Antikörpers zeigte vielversprechende Ergebnisse bei der Therapie von akuter Lungenverletzung.<sup>[204]</sup> Kurze, einzelsträngige D-RNA und L-RNA Oligonucleotide, sogenannte Spiegelmer, zeigten in Mäusen die Fähigkeit, CCL2 spezifisch zu binden und zu inhibieren. Der Mechanismus für die Bindung kann analog zur Antikörper-Antigen Bindung betrachtet werden.<sup>[205]</sup> Diese

---

<sup>3</sup> Durch die State Food and Drug Administration zugelassenes Arzneimittel #S20030093.

<http://app1.sfd.gov.cn/datasearch/face3/base.jsp?tableId=25&tableName=TABLE25&title=%B9%FA%B2%FA%D2%A9%C6%B7&bcId=124356560303886909015737447882>

Spiegelmerne stellen damit eine effektive Strategie zur Bekämpfung von *Lupus nephritis* dar.<sup>[205]</sup> Darüber hinaus zeigt ein kommerziell erhältliches L-RNA Aptamer im Transwell-Assay eine Reduktion der Migration von lymphatischen Leukämie-Zellen durch Inhibition von CXCL12.<sup>[206]</sup>

Die Betrachtung von Strukturelementen kleiner Moleküle, die als Antagonisten für Chemokinrezeptoren wirken, führten zu Erkenntnissen, welche Rolle diese bei der Inhibition spielen können.<sup>[207]</sup> Dadurch kam es zu der Entdeckung eines breiten Spektrums von Antagonisten für die therapeutisch relevanten GPCRs CCR1, CCR2, CCR5, CCR10 und CXCR2, CXCR3 und CXCR4.<sup>[208]</sup> Weiterhin wurde dabei festgestellt, dass die Anzahl der verschiedenen Inhibitorklassen für CC-GPCRs wesentlich größer ist als die für CXC-GPCRs, was den Schluss zulässt, dass die Inhibition der CXC-Rezeptoren generell ein größeres Problem darstellt, als die der CC-Rezeptoren.<sup>[203]</sup> Breitbandinhibitoren für Chemokine sind beispielsweise Aminolactame wie FX125L, das in klinischen Tests als Therapeutikum für Asthma getestet<sup>[209]</sup> und sich mittlerweile in klinischen Tests Phase 2 befindet.<sup>4</sup> Die ersten kleinen Moleküle, die als spezifische Inhibitoren für die Wechselwirkung von CXCR1 mit CXCL8 entdeckt wurden, sind Ketoprofen (Abbildung 2.5), die durch Rezeptorwechselwirkung dessen Aktivierung blockieren.<sup>[210]</sup> Beispielsweise bindet Repertaxin, ein nicht-kompetitiver allosterischer Inhibitor für CXCR1 und CXCR2, der entwickelt wurde, um Reperfusionsschäden zu reduzieren, an diese GPCRs und fixiert sie in einer inaktiven Konformation.<sup>[210-212]</sup>

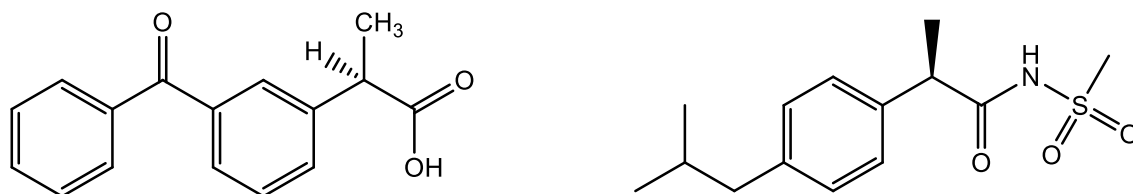


Abbildung 2.5: (R)-Ketoprofen (links) und Repertaxin (rechts). Kleine Moleküle, die die Wechselwirkung von CXCL8 mit dessen Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 inhibieren.

Diese Moleküle zeigten die Fähigkeit *in vitro* chemotaktische Aktivität von humanen Neutrophilen und Monozyten auszuschalten<sup>[213-214]</sup> und in klinischen Tests das Potenzial ischämische Reperfusionsschäden zu reduzieren.<sup>[215]</sup> Einige DNA-Viren, wie Herpes- und Pockenviren, unterdrücken die Interaktion von Chemokinen mit ihren Rezeptoren durch die Produktion von Proteinen, die Chemokine oder ihre Rezeptoren strukturell nachahmen, ohne aber selbst eine immunologische Aktivität zu besitzen.<sup>[216-218]</sup> Weitere natürliche Chemokininhibitoren, kleine Proteine, die man Evasine nennt, sind im Speichel von Zecken enthalten. Diese sorgen dafür, dass eine Immunantwort gegen den Zeckenbiss ausbleibt und diese damit nicht sofort bemerkt wird. Evasin-1 ist ein klinisch getesteter spezifischer Antagonist, der die Chemokine CCL3, CCL4 und CCL12 mit einer Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich inhibiert.<sup>[219]</sup> Alenazi *et al.* beschrieben zwei Evasine, die 22 verschiedene CC-Chemokine und 6 verschiedene CXC-Chemokine in Zellmigrationsassays inhibieren.<sup>[220]</sup>

Eine Möglichkeit, verbesserte Liganden für ein Zielmolekül zu generieren, ist die Modifikation natürlich vorkommender oder bereits bekannter synthetischer Bindungspartner mit Affinität zum Zielmolekül. Durch Nachahmung der nativen Struktur der Bindungsstelle des Rezeptors, werden weitere Möglichkeit eröffnet, Interaktionen zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren zu untersuchen.<sup>[79, 221]</sup> Peptide und Proteine, die von den entsprechenden GPCRs abgeleitet wurden, sind dabei beliebte Werkzeuge für die Untersuchung von Chemokin-Rezeptor-Interaktionen.<sup>[222]</sup> Durch Fusion von einzelnen Sequenzelementen aus

<sup>4</sup> <https://adisinsight.springer.com/drugs/800030523> (Zugriff 11.12.2019)



---

Chemokinrezeptoren mit einem löslichen Proteingerüst (z.B. der  $\beta_1$  Domäne des G-Proteins) werden CROSS-Proteine erhalten (vgl. Kapitel 2.1.1), die zwar bisher nicht auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten untersucht wurden, aber im niedrigen mikromolaren Affinitätsbereich an Chemokine binden können.<sup>[79]</sup> Auch wurden Sequenzabschnitte von Chemokinen oder deren Rezeptoren synthetisiert und auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht. Die ersten Peptide mit der Fähigkeit, eine Antwort auf CXCL8 zu inhibieren, wurden auf diese Weise bereits 1993 entwickelt.<sup>[223]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die chemotaktische Aktivität humaner Neutrophile gegenüber CXCL8 durch Interaktion mit einem aus dem CXCL8 N-Terminus abgeleiteten Peptid CXCL8(3-25) inhibiert/unterdrückt wird.<sup>[48, 74]</sup> Analog zu dieser Herangehensweise wurden Peptide aus dem N-Terminus des Rezeptors CXCR1, der eine Bindungsstelle für CXCL8 darstellt, abgeleitet. Die Sequenz dieser Peptide besteht aus zwei Teilsequenzen des N-Terminus, die über einen Spacer verknüpft sind und die CXCL8 Interaktionsstellen für die N-Schleife, 40S-Schleife,  $3_{10}$ -Helix und den  $\beta_3$ -Strang enthalten.<sup>[224-225]</sup> Eines dieser Peptide, CXCR1-p1, mit der Sequenz MWFDD-Ahx-MPPADEDYSP, wurde aus den Teilsequenzen CXCR1(9-14) und CXCR1(20-29) verknüpft durch einen 6-Aminohexansäure-Linker hergestellt und eingehend studiert. Der  $K_i$  des Peptids CXCR1-p1 liegt bei etwa 7  $\mu$ M und NMR-Studien zeigten, dass es eine ungeordnete Struktur besitzt.<sup>[77, 224-225]</sup> In ähnlichen Studien wurden Peptide aus dem N-Terminus von Kaninchen CXCR1 entwickelt, sowie die N-terminale Domäne von CCR3 als Inhibitor für CCL11 abgeleitet.<sup>[185, 226]</sup> In Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe (Prof. Schmitz, TU Darmstadt) wurde durch MD Simulationen des CXCR1/CXCL8 Komplexes und eingehender Untersuchung der extrazellulären Schleifen 2 und 3 von CXCR1, ein Peptid postuliert, das die „site II“ Bindungsstelle des Rezeptors für CXCL8 nachahmt. Dieses Peptid, IL8RPLoops, zeigt eine Affinität im unteren mikromolaren Bereich für CXCL8 und inhibiert die CXCL8-vermittelte Chemotaxis von Neutrophilen.<sup>[227]</sup> Weitere Peptidsequenzen wurden auf ähnliche Weise in anderen Arbeitsgruppen aus den drei extrazellulären Schleifen von CCR5 und CXCR4 abgeleitet.<sup>[228-229]</sup> Ersteres inhibiert die Wechselwirkung des HIV-Glycoproteins gp120 mit CCR5 und verhindert dadurch aktiv eine Infektion von T-Zellen durch HIV-Stämme, die CCR5 erkennen.<sup>[228]</sup> Ein aus CXCR4 hergeleitete Fusionspeptid der extrazellulären Schleifen 1 und 3 zeigte eine submikromolare Affinität und das gleiche Verhalten gegenüber X4-tropen HIV Stämmen.<sup>[229]</sup> Darüber hinaus konnten Peptide aus individuellen extrazellulären Schleifen von CXCR4 eine moderate Inhibition der Virusaufnahme in T-Zellen bewerkstelligen, wobei ein Peptid aus Schleife 2 gleichzeitig die Wechselwirkung zwischen CXCL12 mit CXCR4 ( $IC_{50} = 20 \mu$ M) und CXCR7 ( $IC_{50} = 100 \mu$ M) inhibierte.<sup>[230]</sup>

---

### 2.2.3. Strategien zur Inhibitorentwicklung

---

Strukturinformationen des Zielmoleküls, seines Bindungspartners oder eines Komplexes beider Bindungspartner können mit Hilfe von hochauflösenden Analysenmethoden, wie beispielsweise Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie generiert werden. Sind die Daten vorhanden, lassen sich durch *in silico* Experimente Substitutionen in das Zielprotein einfügen und durch Docking Bindungsaffinitäten berechnen. Man kann beispielsweise durch Betrachtung des Rezeptor-Ligand-Komplexes molekulare Kontaktstellen identifizieren und durch Einfügen weiterer Kontakte eine höhere Affinität erzeugen. Die *in silico* Daten müssen im Anschluss durch Synthese und Bindungsstudien

der vielversprechendsten Strukturen bestätigt werden. Meist werden mehrere Kandidaten ausgewählt, um die aufgrund des Modells postulierten Designhypothesen zu überprüfen. Basierend auf den experimentellen Befunden kann das Modell weiter optimiert oder die Hypothese widerlegt und eine neue entwickelt werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Eigenschaften von Liganden für ein Zielprotein gezielt zu modellieren, um diese zu verbessern oder zu erweitern. Diese Herangehensweise bietet auch den Vorteil, dass man bereits eine Hypothese für den Bindemechanismus der neuen Liganden erhält.<sup>[231]</sup>

In alternativen Herangehensweisen durchmustert man große Mengen von unterschiedlichen Liganden. Kombinatorische Ansätze, in denen randomisierte Substanzbibliotheken hergestellt werden, bieten sich für die Inhibitorentwicklung an. Diese können chemisch synthetisiert oder im Fall biologischer Bibliotheken durch gelenkte Evolution generiert werden. Solche biologische Bibliotheken finden Anwendung in verschiedenen Display-Techniken wie Hefe-, mRNA-, Phage-, Ribosom- oder Bakterien-Displays.<sup>[232-241]</sup> Dabei werden häufig natürliche Mechanismen wie DNA-Replikation oder das Präsentieren von Peptiden auf der Zelloberfläche ausgenutzt, um eine Sequenzierung der Bibliothek durch eine schnelle Amplifikation der codierenden Sequenz zu erleichtern. Die benötigten DNA-Bibliotheken für verschiedene biologischen Displays werden entweder biologisch durch Rekombination und Mutation oder durch kombinatorische chemische DNA-Synthese erhalten.<sup>[242]</sup>

Das Phage-Display ist die am häufigsten verwendete Methode zur Darstellung und Analyse biologischer Bibliotheken und wurde schon früh zur Entwicklung von Antikörper Fab Fragmenten eingesetzt.<sup>[237, 243]</sup> Es können mit dieser Methode Bibliotheken mit über  $10^9$  verschiedenen Peptiden, die bis zu 40 Aminosäuren lang sind, synthetisiert und anschließend analysiert werden.<sup>[244]</sup> Ein Screening von verschiedenen Sequenzabschnitten von Chemokinrezeptoren mit randomisierten Bereichen auf rekombinanten Phagen in Mikroarrays gegen 31 verschiedene Chemokine sollte Peptidsequenzen identifizieren, die mit einer mittleren bis niedrigen Affinität gleichzeitig die Aktivität mehrerer Chemokine beeinflussen. Die dabei ausgewählten Sequenzen WVFNGAMCK und LFGNDCE zeigten eine Aktivität gegenüber DTH (*delayed type contact hypersensitivity*) bei Mäusen.<sup>[245]</sup> Weiterhin wurde Phage-Display verwendet, um Inhibitorpeptide zu generieren. Dabei konnten beispielsweise FWDDFW ( $IC_{50} = 10 \mu M$ ) und SAMWDF ( $IC_{50} = 9.1 \mu M$ ) als Inhibitoren für die Interaktion von CXCL8 mit Neutrophilen identifiziert werden.<sup>[246-247]</sup> Nach Inkubation mit dem Zielmolekül und Auswaschen der nicht-bindenden Phagen werden die erhaltenen Hits angereichert und anschließend dafür genutzt, weitere Bakterien zu infizieren, um eine Amplifikation der DNA für die Sequenzierung zu erreichen oder weitere Zyklen unter stringenteren Bedingungen durchzuführen. Ähnliche Display-Verfahren werden auch mit Hefen und Bakterien durchgeführt.<sup>[233, 248]</sup> In Arbeiten von Singh *et al.* wurde ein Hefe-Display verwendet um 10 polyvalente CC-Chemokin bindende Peptide zu identifizieren.<sup>[249]</sup> Diese Technik wurde in Arbeiten der Gruppe weiter verwendet um Evasine zu identifizieren, die gezielt an CXC-Chemokine binden und CXCL8 im unteren nanomolaren Bereich inhibieren.<sup>[220]</sup>

Wie bei der gelenkten Evolution kann man auch bei der chemischen Synthese von Peptid- und Peptidomimetika-Bibliotheken kombinatorische Ansätze wählen, um Bibliotheken mit potenziellen Inhibitoren zu generieren.<sup>[250-258]</sup> Ein Screening von synthetischen Bibliotheken wird meist durch fluoreszenzbasierte, magnetpartikelbasierte Verfahren oder durch Kodierung der Synthesepartikel mit DNA durchgeführt.<sup>[1, 250-251, 259-261]</sup> Ein Vorteil dieser Techniken ist, dass keine Strukturinformationen der Ausgangssubstanz vorhanden sein müssen. Allerdings lassen sich Bibliotheken ab einer gewissen Größe nur mit erheblichem Arbeits- und Zeitaufwand einem Screening unterziehen. Die Synthese und das Screening chemischer Bibliotheken von Peptiden und Peptidomimetika wird in Kapitel 2.3.2 näher beschrieben.

Die verwendeten Screeningmethoden für chemisch und biologisch generierte Substanzbibliotheken variieren stark abhängig vom Anwendungsgebiet und den Mitteln der Laboratorien, in denen sie durchgeführt werden.

---

Die Zielstruktur wird häufig direkt immobilisiert (*panning*) oder für spätere Immobilisierung mit Ankergruppen versehen (*pull-down*). Nicht gebundene Substanzen werden ausgewaschen, während gebundene amplifiziert, mutiert und erneut durchmustert werden. Alternativ bieten sich aber auch Screenings mit farbgebenden Substanzen an, beispielsweise die Umsetzung eines signalgebenden Substrates durch angebundene Enzyme. So wurde durch Screening einer kombinatorischen Bibliothek bestehend aus Hexapeptiden gegen *Staphylococcus aureus* zum Beispiel das kleine Peptid Antileukinat entdeckt.<sup>[262-263]</sup> Dieses Peptid mit der Sequenz Ac-RRWWCR-NH<sub>2</sub> inhibiert die durch CXCL8 ausgelöste Chemotaxis von Neutrophilen und die Bindung von CXCL1 an humane Melanomzellen.<sup>[264-266]</sup>

---

## 2.3. Peptidomimetika und Peptoide

---

Im Allgemeinen sind Peptidomimetika Substanzen, die von ihrer Struktur her Peptide und Proteine nachahmen. Hierzu zählen beispielsweise Oligomere und Polymere, bestehend aus Peptidsequenzen mit nicht-natürlichen Aminosäuren oder Aminosäure-ähnlichen Grundbausteinen, die sich durch eine intrinsische biologische Aktivität auszeichnen. Auch Derivate der natürlichen Struktur, wie beispielsweise zyklisierte Peptide zählen hierzu.<sup>[267-269]</sup> Darüber hinaus haben Peptidomimetika oft verbesserte Eigenschaften gegenüber den entsprechenden Peptiden, wie beispielsweise eine hohe Bioverfügbarkeit, erhöhte Rigidität und dadurch eine verbesserte Stabilität und Affinität, so dass ein großes Interesse an der Entwicklung neuer peptidomimetischer Arzneistoffe besteht. Für die Synthese von Peptidomimetika, die sich entweder an die Sequenz eines Zielpolypeptids anlehnen oder die Bindungstasche eines Proteins nachbilden, gibt es generell drei verschiedene Herangehensweisen. Die für die biologische Aktivität wichtigen Funktionalitäten des Peptids oder Proteins können auf einem synthetischen Gerüst wiedergegeben werden, das lediglich die räumliche Orientierung und Struktur der Ursprungssubstanz abbildet.<sup>[269]</sup> Funktionale Peptide können durch Zyklisierung in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden, um so eine rigidiere dreidimensionale Struktur zu erzeugen und einen Stabilitätsgewinn herbeizuführen.<sup>[269]</sup> Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Aminosäuren selbst entweder an den Seitenketten oder am Peptidrückgrat direkt zu modifizieren.<sup>[269]</sup>

Eine Klasse von Peptidomimetika, die durch Modifizierung des Peptidrückgrats entstehen, sind die Peptoide. Sie wurden erstmals im Jahre 1992 von Zuckermann *et.al.* als N-substituierte Glycin-Oligomere beschrieben und zeigen im Vergleich zu Peptiden eine hohe orale Bioverfügbarkeit, Stabilität gegenüber Proteasen und eine höhere strukturelle Flexibilität.<sup>[264, 270-275]</sup> Das Rückgrat von Peptoiden zeichnet sich dadurch aus, dass die Seitenketten, die in Peptiden vom  $\alpha$ -Kohlenstoff ausgehen, formal an den N-terminalen Stickstoff verschoben sind. Dadurch ist die Position der Carbonylgruppe und die der Seitenkette vertauscht. Die Sequenz muss im Vergleich zu Peptiden also in umgekehrter Reihenfolge synthetisiert werden, wenn die Abfolge der Seitenketten und Carbonylgruppen der eines Peptids gleichen soll (Abbildung 2.6).

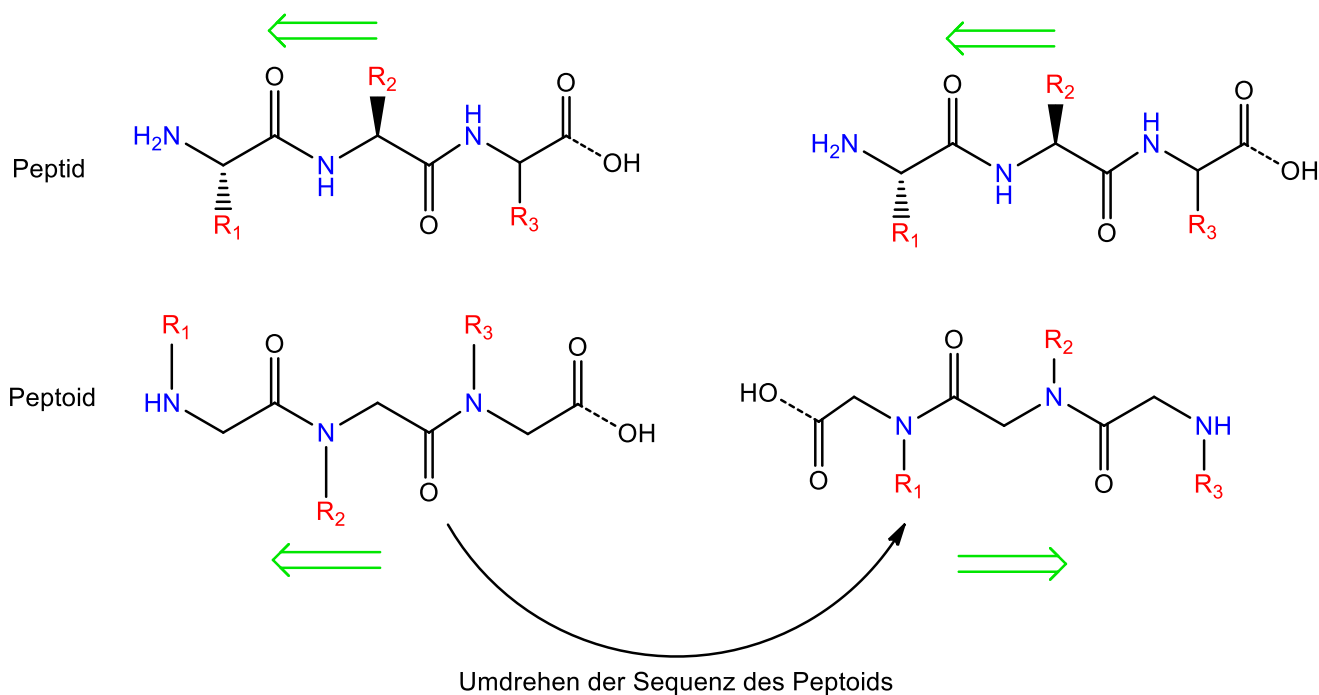
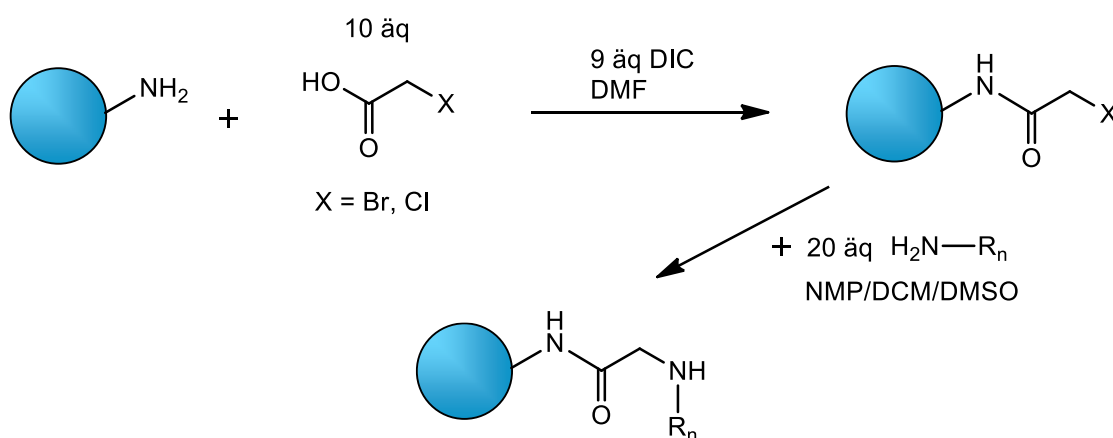


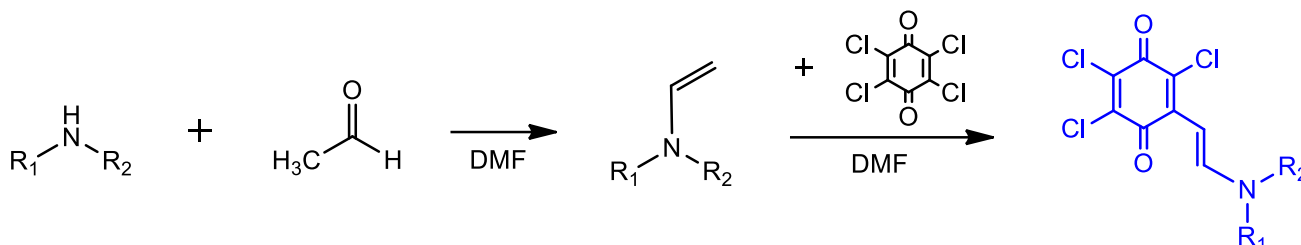
Abbildung 2.6: Peptidrückgrat (oben) im Vergleich mit einem Peptoidrückgrat (unten). Links wurden beide Strukturen übereinandergelegt um zu zeigen, dass die Seitenketten in entgegengesetzte Richtungen schauen. Rechts wurden N- und C-Terminus des Peptoids vertauscht und die Sequenz umgekehrt, um zu zeigen, dass die Seitenketten und Carbonylgruppen nun die gleiche Abfolge haben. Die Syntheserichtung ist mit grünen Pfeilen angegeben.

Die Synthese von Peptoiden kann auf zwei Weisen durchgeführt werden: durch Einzelkuppelung fertiger, mit Schutzgruppen versehener Peptoidmonomere, äquivalent zur Peptidsynthese (Monomermethode) oder durch die Submonomermethode, die auf abwechselnder Acylierung mit einer Halogenessigsäure und Alkylierung durch Substitution des Halogens mit einem primären Amin basiert (Schema 2.1).<sup>[271, 276]</sup>



Schema 2.1: Submonomermethode zur Synthese von Peptoiden. Acylierung im ersten Schritt durch Brom- oder Chloressigsäure. Aminierung im zweiten Schritt durch Substitution des Halogens. mit

Bei der Monomermethode kann durch Abspalten und photometrische Quantifizierung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe die Reaktion verfolgt werden. Jedoch kann der Reaktionsfortschritt bei beiden Methoden, wie auch bei der Peptidsynthese, colorimetrisch durch einen Chloraniltest verfolgt werden bei dem p-Chloranil (Tetrachloro-1,4-benzochinon) in Anwesenheit von Acetaldehyd mit primären und sekundären Aminen zu Derivaten des blauen Farbstoffs Trichloroaminovinyl-1,4-benzochinon umgesetzt wird (Schema 2.2).<sup>[277-279]</sup>



Schema 2.2: Chloraniltest zur qualitativen Bestimmung von sekundären Aminen. Sekundäre Amine reagieren mit Acetaldehyd unter Bildung eines Enamins, das mit p-Chloranil zu einem blauen Farbstoff reagiert.

Durch ihre große Ähnlichkeit mit Peptiden, zeichnen sich Peptoide dadurch aus, dass sie gut in biologische Prozesse eingreifen können. Sie wurden beispielsweise als zelluläre Transporter, als antimikrobielle Ampetoide und bewuchshindernde (*antifouling*) Stoffe eingesetzt.<sup>[272, 280-285]</sup> Da durch das Verschieben der Seitenkette vom  $\alpha$ -C an den Stickstoff die Voraussetzung für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen über das Polymerrückgrat bei Peptoiden nicht mehr gegeben ist, gehen durch direkte Übersetzung von vorhandenen Peptidsequenzen in Peptoidsequenzen meist alle Strukturinformatonen der Sequenz verloren. Des Weiteren führt eine Sequenzübersetzung dazu, dass die primären Carbonsäureamide, die die Verknüpfungsstelle der einzelnen Monomere in einem Peptid darstellen, durch sekundäre Amidbindungen ersetzt werden und eine freie drehbare Methylengruppe entsteht. Dies hat eine starke Erhöhung der Rückgratflexibilität zur Folge.<sup>[270]</sup> Aufgrund der Mesomeriestabilisierung primärer Amide liegen in der Peptidbindung alle beteiligten Atome planar in einer Ebene und können nicht gegeneinander verdreht werden. Der Torsionswinkel  $\omega$  der Amidbindung in Peptiden liegt daher normalerweise bei  $\omega = 180^\circ$ . Die trans-Konfiguration ist hier gegenüber der cis-Konfiguration bevorzugt, mit Ausnahme von Sequenzen, die Prolin beinhalten.<sup>[286]</sup> Peptoide hingegen weisen einen sehr variablen  $\omega$ -Winkel zwischen  $180^\circ$  und  $20^\circ$  mit einer gleichmäßigen Verteilung zwischen trans- und cis-Konfiguration auf, da eine Umwandlung der Konformationen unabhängig von der Seitenkette vonstattengehen kann.<sup>[273-274]</sup> Um stabile Sekundärstrukturelemente in Peptoidsequenzen einzuführen, müssen diese speziell konstruiert werden und die verwendeten Monomere müssen sperrige Seitenketten aufweisen. So ist es möglich,  $\alpha$ -helikale oder  $\beta$ -strängige Strukturen durch Einführen von chiralen Zentren in Nachbarschaft des Stickstoffs zu erzeugen.<sup>[287-290]</sup> Eines der ersten Peptoide mit proteinähnlicher Struktur wurde nach dem Vorbild einer Kollagen Trippelhelix rekonstruiert.<sup>[291]</sup> Diese Strukturen waren allerdings unlöslich oder instabil in wässrigen Medien bis Zuckermann *et. al.* Im Jahre 2002 das erste stabile  $\alpha$ -helikale und wasserlösliche Peptoid aus 36 Monomeren beschrieben.<sup>[292]</sup> Seitdem wurde ein weites Spektrum von verschiedenen wasserstabilen Foldameren entwickelt, zu denen selbstaufbauende Nanosheets, Bänderstrukturen und multihelikale Tertiärstrukturen zählen, die sogar dazu befähigt sind, Metallionen in einer proteinähnlichen Art zu komplexieren.<sup>[293-296]</sup> Durch Einfügen von einzelnen Peptoidbausteinen in Peptidsequenzen, lassen sich Hybride synthetisieren, die die Vorteile beider Substanzklassen miteinander vereinen können. Diese sogenannten Peptomere zeichnen sich beispielsweise durch erhöhte Proteasestabilität und Sekundärstrukturen, wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter aus.<sup>[253]</sup>

---

Bisher wurde sich noch nicht auf eine einheitliche Nomenklatur von Peptoiden geeinigt. Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen für Peptoidsequenzen wurden vom Dreibuchstabencode der äquivalenten Aminosäuren abgeleitet und von Culf *et al.* eingeführt.<sup>[5]</sup> Dabei wird dem Dreibuchstabencode der Aminosäure ein N für die Substitution am Stickstoff vorangestellt und mit einem hochgestellten Index versehen, der angibt, um wie viele CH<sub>2</sub>-Inkrementen die Seitenkette des Peptoids im Vergleich zur natürlichen Aminosäure verlängert oder verkürzt wurde (siehe Kapitel 4.4.1).

---

### 2.3.1. Inhibitorische Peptidomimetika

---

Um Peptidomimetika mit inhibitorischer Aktivität zu erhalten, bieten sich verschiedene Möglichkeiten. Zum einen können bekannte inhibitorische Peptidsequenzen teilweise oder vollständig direkt in N-substituierte Glycin-Oligomere übersetzt werden, wobei Peptomere respektive Peptoide entstehen. Dieses Vorgehen liefert für gewöhnlich Sequenzen mit einer ähnlichen biologischen Aktivität und Affinität gegenüber Zielmolekülen der Ursprungssequenz. Es muss allerdings darauf geachtet werden, dass die Synthese von Peptoiden in umgekehrter Reihenfolge erfolgen muss, wenn die Reihenfolge der Atome im Oligomerrückgrat gleich bleiben soll. Außerdem lassen sich sekundäre Strukturelemente, die von einer bestimmten Peptidsequenz eingenommen werden, oft nicht durch die analoge Peptomer- oder Peptoidsequenz abbilden (siehe Kapitel 2.3). Beispielsweise zeigt Thermolysin eine  $K_i = 1.8 \mu\text{M}$  und die korrespondierende Peptoidsequenz eine  $K_i = 15 \mu\text{M}$ .<sup>[297]</sup> Der kleine  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor Ac-WRY-OMe hingegen weist eine  $K_i = 100 \mu\text{M}$  und das entsprechende Peptoid eine  $K_i = 200 \mu\text{M}$  auf.<sup>[270]</sup> Durch Radioligand-Bindungsstudien konnte am Beispiel mehrerer Somatostatin-Analoga sogar eine im Vergleich zum Peptid höhere Affinität für einige Somatostatin-Rezeptoren gezeigt werden (hsst3:  $K_d$  Peptid = 525 nM,  $K_d$  Peptoid = 282 nM; hsst4:  $K_d$  Peptid = 8913 nM,  $K_d$  Peptoid = 4680 nM).<sup>[298]</sup>

Eine weitere Möglichkeit, biologisch aktive Peptoidsequenzen zu generieren, bietet die kombinatorische Chemie. Durch SPOT-Synthese auf Zellulose-Membranen, Microarrays oder Mix-and-Split-Synthese, kann eine Vielzahl von verschiedenen Substanzen gleichzeitig und sogar vollautomatisiert synthetisiert und anschließend einem Screening unterworfen werden.<sup>[250-258]</sup> Aus einer Pentapeptoid Bibliothek, die mit Hilfe eines Magnetpartikel-basierten Verfahrens gegen Anti-FLAG Antikörper durchmustert wurde, konnten jeweils drei bis vier Kopien von insgesamt 9 verschiedenen Hits erhalten werden, die eine hohe Sequenzhomologie und Dissoziationskonstanten zwischen 75 nM und 150 nM aufweisen.<sup>[259]</sup> Eine Heptapeptomer *One-Bead-One-Compound* (OBOC) Bibliothek wurde einem Screening gegen Streptavidin unterzogen. Die resultierenden Peptomere konnten Biotin mit einem IC<sub>50</sub> zwischen 25  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  verdrängen.<sup>[253, 299-300]</sup> In vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz (TU Darmstadt), führte das Screening einer Hexapeptoid-Bibliothek gegen CXCL8 zu 17 Hits, die eine Affinität zwischen 11  $\mu\text{M}$  und 112  $\mu\text{M}$  aufweisen.<sup>[1, 3]</sup>



---

### 2.3.2. Synthetische kombinatorische Bibliotheken von Peptiden und Peptidomimetika

---

Die Analyse großer Substanzbibliotheken mit großer chemischer Diversität ermöglicht es, eine große Zahl spezifischer Bindungspartner für ein Zielprotein zu finden und sogar strukturelle Zusammenhänge zwischen den einzelnen Hits zu ergründen. Es existieren diverse Synthese- und Screening-Methoden für diese Bibliotheken, die verschiedene Substanzklassen beinhalten können. Der Unterschied zwischen biologischen und chemischen Bibliotheken wurde bereits in Kapitel 2.2.3 herausgearbeitet.

Peptid-Bibliotheken können entweder in Lösung oder durch Synthese auf einer festen Phase hergestellt werden. Eine Methode Peptide auf fester Phase zu synthetisieren wurde bereits 1963 von Merrifield entwickelt.<sup>[301]</sup> Als Synthesematrix diente Merrifield hierfür ein chloromethyliertes Polystyrol-Harz, auf das die einzelnen Aminosäuren schrittweise aufgebracht werden konnten.<sup>[301]</sup> Diese Vorgehensweise hat gegenüber der Synthese in Lösung zum Vorteil, dass eine einfache Abtrennung von gelösten Nebenprodukten und überschüssigen Edukten nach jedem Syntheseschritt gewährleistet wird und der Prozess leicht automatisierbar ist. Nachteilig ist der hohe Materialaufwand, da Edukte im Überschuss eingesetzt werden müssen und einige Nebenprodukte sowie nicht abreagierte Ketten, die auf der festen Phase verankert sind, nicht abgetrennt werden können. Eine Methode, die Synthese von Peptid-Bibliotheken mit der Festphasensynthese zu verbinden, bietet die im Jahr 1991 von Furka entwickelte „Split-and-Pool“ Methode (auch „Mix-and-Split“-Methode).<sup>[302]</sup> Diese Technik wurde später von Lam *et. al.* weiterentwickelt, um sogenannte „One-Bead-One-Compound“ (OBOC) Bibliotheken herzustellen, in denen jeder einzelne Harzpartikel jeweils eine einzige Sequenz der synthetisierten Makromoleküle trägt.<sup>[303-304]</sup> Zur Synthese von Peptidbibliotheken wird das Syntheseharz dabei in mehrere Reaktionsgefäße aufgeteilt, in denen jeweils eine Aminosäure mit dem Harz zu Reaktion gebracht wird. Nach dem Vereinigen und Mischen aller Harzpartikel und dem Entfernen der N-terminalen Schutzgruppen wird das Harz für die Kupplung der nächsten Aminosäure aufgeteilt. Wenn sich die Anzahl der Aminosäuren in jeder Position nicht unterscheidet entstehen  $N = x^i$  mögliche Peptide mit einer Länge von  $i$ , wobei in jeder Position  $x$  verschiedene Aminosäuren eingesetzt werden (Abbildung 2.7).

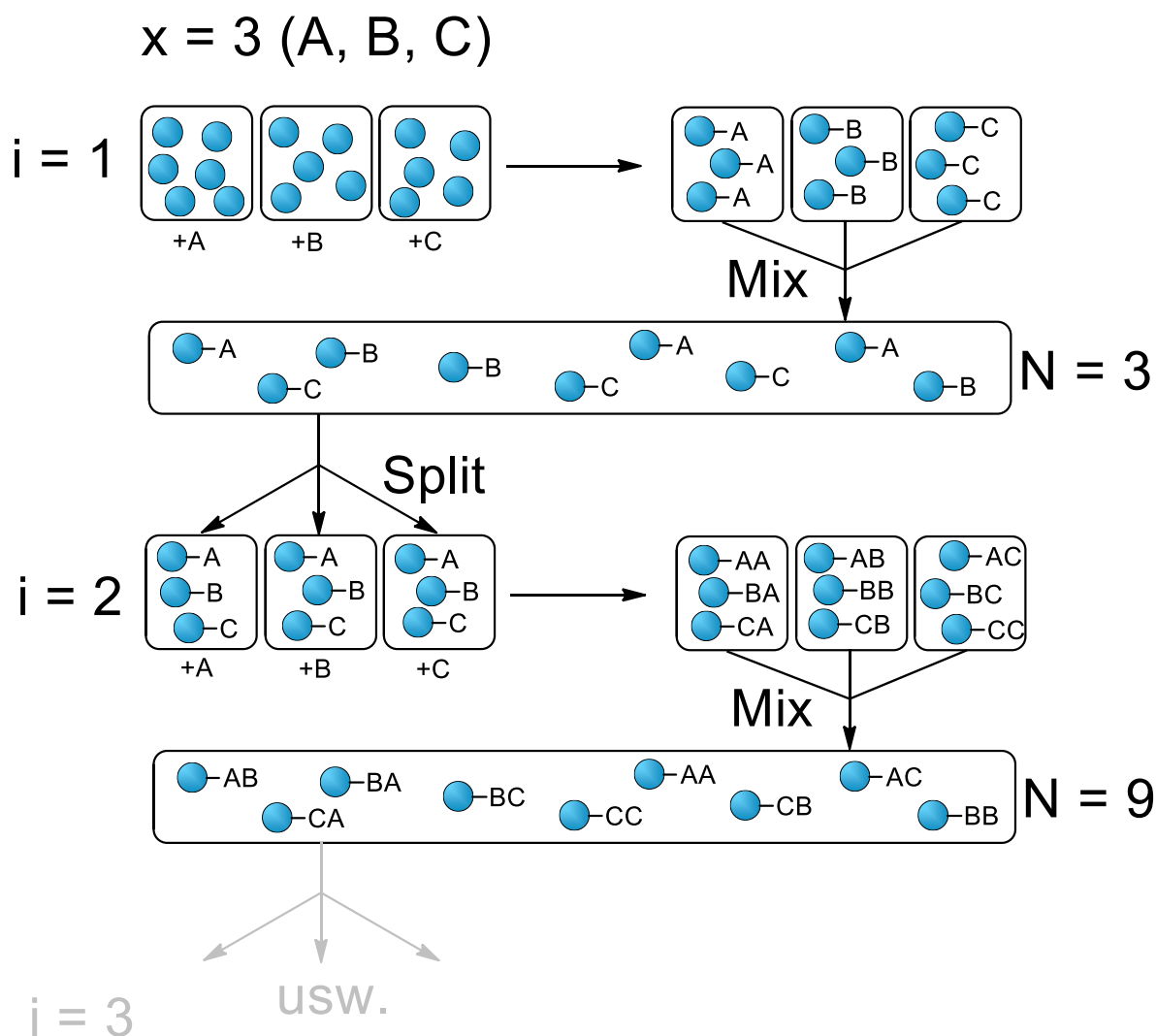


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Mix-and-Pool-Synthese. Jeder Reaktionsschritt  $i$  wird mit  $x$  Bausteinen durchgeführt. Anschließend werden die Reaktanden gemischt und wieder gleichmäßig aufgeteilt für den nächsten Reaktionsschritt. Es entstehen  $N=x^i$  unterschiedliche Substanzen mit einer Länge von  $i$ .

Durch diese Methode können auch Bibliotheken aus kleinen Molekülen und nicht peptidischen Oligomeren generiert werden, die sich relativ einfach durch Bindung mit markierten Liganden in colorimetrischen oder fluorimetrischen Methoden (Spektroskopie oder Mikroskopie) ohne Codierung der Partikel auswerten lassen.<sup>[304]</sup> Dies hat den Vorteil, dass ein Screening auch ohne aufwändige Gerätschaften durchgeführt werden kann. Chemische oder synthetische kombinatorische Bibliotheken werden für gewöhnlich mit Hilfe von Assays durchmustert, die sich leicht auslesen lassen, wie kolorimetrische oder fluoreszenzbasierte *in vitro* Assays. Je nach Partikelgröße kann mit automatisierten Partikelsortern (COPAS™) oder *flow sorter* (*fluorescent-activated cell sorting* – FACS) gearbeitet werden. Größere Partikel können auch unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewählt und per Hand separiert werden. Eine weitere schnelle und effektive Methode, Liganden aus einer Bibliothek in einem Schritt zu screenen und zu separieren bieten funktionalisierte superparamagnetische Partikel. Diese funktionalisierten Magnetitpartikel binden an Liganden der Bibliothek und ermöglichen es, diese durch einen Magnetseparator oder Handmagneten einfach von der restlichen Bibliothek zu trennen.<sup>[259]</sup> Bei allen Screeningmethoden wird meist nur zwischen nicht-bindenden und bindenden Substanzen unterschieden, deren Sequenz nach positivem Screening



identifiziert wird, um die entsprechenden Verbindungen in ausreichender Menge zu synthetisieren und weiter charakterisieren zu können. Die Methode, nach der die Identifizierung der Hits durchgeführt wird, hängt dabei stark von der Bibliothek oder der verwendeten Kodierungsstrategie dieser ab.

Die Sequenzanalyse von nur einem Synthesepartikel stellt aufgrund der geringen Substanzmenge eine Herausforderung dar, da keine einfache Signalverstärkung analog zur PCR bei der DNA-Sequenzierung für die Analyse von Komponenten biologischer Bibliotheken durchgeführt werden kann (vgl. Kapitel 2.2.2). Im Fall von Bibliotheken von Peptiden und Peptidomimetika, kann die Sequenzierung aber ohne DNA-Codierung, durch fragmentierende Methoden wie Edman-Abbau, Sanger-Sequenzierung oder MALDI-TOF MS/MS durchgeführt werden.<sup>[305-306]</sup>

Beim Edman-Abbau werden durch Reaktion von Peptid-N-Termini mit Phenylisothiocyanat Phenyl(thio)carbamoyl-Peptide hergestellt. Dabei werden die einzelnen N-terminalen Aminosäuren durch Reaktion mit Phenylisothiocyanat in jedem Reaktionsschritt als Phenylthiohydantoine abgespalten, während die Reaktionsprodukte von Phenylisocyanat unter Abspaltbedingungen stabil sind. Es entstehen dabei Fragmente, die die gesamte Sequenz des ursprünglichen Peptids abdecken und durch MALDI-TOF MS analysiert werden können. Die Sanger-Sequenzierung beruht auf der sauren Hydrolyse des Peptids in Fragmente verschiedener Größe, die anschließend N-terminal mit 2,4-Dinitrochlorbenzol markiert werden und komplementär zum Edman-Abbau über z.B. Massenspektrometrie analysiert werden können. Auch andere Markierungen, wie beispielsweise Halogenierungen an multifunktionalem Harz, sind möglich, um die Analyse durch massenspektrometrische Methoden zu erleichtern und Substanz-Bibliotheken zu analysieren.<sup>[307-309]</sup> Bei der Sequenzierung von Peptidomimetika durch MALDI TOF MS/MS macht man sich zu Nutze, dass diese bei der Fragmentierung in charakteristischen Fragmente zerfallen. Beispielsweise zerfallen Peptide hauptsächlich in ihre Y- und B-Fragmente (Abbildung 2.8).<sup>[310-311]</sup>

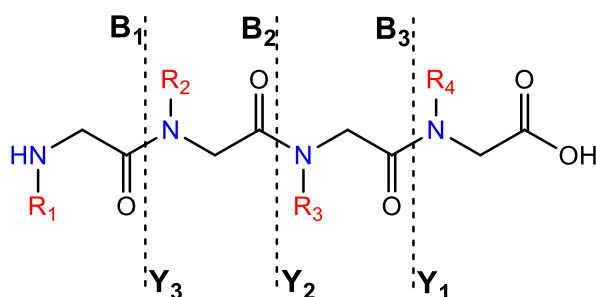


Abbildung 2.8: Fragmentierung von Peptoiden in ihre charakteristischen Y- und B-Fragmente durch MALDI TOF MS/MS. Y+2H<sup>+</sup> ist das Fragment mit der ergiebigsten Ionenausbeute nach der Fragmentierung.<sup>[310-311]</sup>

Um eine Sequenzierung der Hits nach einem Screening zu umgehen, ist es auch möglich, die einzelnen Substanzen einer Bibliothek schon während der Synthese zu codieren. Dies kann durch verschiedene Techniken gewährleistet werden, wie beispielsweise die Codierung durch örtliche, graphische und chemische Methoden oder mit Hilfe von Isotopenmarkierung.<sup>[312]</sup> Die Synthese und das Screening kombinatorischer Bibliotheken wurden anfänglich getrennt durchgeführt, indem die Substanzen zunächst synthetisiert und anschließend auf eine Oberfläche aufgefropft wurden. Dabei kann die Identifizierung der Substanzen vor oder auch nach dem Aufbringen an die feste Matrix erfolgen.<sup>[313]</sup> Beispielsweise werden bei dem „Dot-Blot“ vorsynthetisierte DNA-Sequenzen, Peptide oder andere Naturstoffe auf eine Nitrozellulosemembran gedruckt, um Microarrays herzustellen, bei denen jede Substanz aufgrund ihrer Position in der Matrix zugeordnet werden kann.<sup>[314-318]</sup> Die Codierung einer Bibliothek durch positionsabhängige Methoden kann zum Beispiel

---

als Abwandlung des Dot-Blots durchgeführt werden, bei dem ein Microarray verschiedener Substanzen in Parallelsynthese hergestellt wird. Dies kann durch die direkte Zufuhr verschiedener Reagenzien auf das gewünschte Raster durchgeführt werden.<sup>[313]</sup> Um dies zu gewährleisten bieten sich zum Beispiel separate Fluss-Kanäle oder Drucktechnologien an.<sup>[319-320]</sup> Durch Eintauchen eines Arrays von funktionalisierten Polystyrol-Stäbchen in verschiedene Reaktionsgefäße kann die Multipin-Peptidsynthese durchgeführt werden, bei der die Sequenzen auf jedem Stäbchen durch die Reihenfolge, in der die individuellen Stäbchen eingetaucht wurden, zurückverfolgt werden kann.<sup>[321]</sup> Wird eine Zellulose-Membran oder Glas als Trägermaterial für die Herstellung von Peptid-Microarrays verwendet, nennt sich diese Technik SPOT-Synthese.<sup>[322]</sup> Durch Verwenden von Aminosäuren mit photospaltbaren Schutzgruppen und einem Glaträgers als Synthesematrix, entwickelten Fodor *et. al.* eine Methode mit der 1024 Pentapeptide in einem 1.6 mm<sup>2</sup> Array abgebildet wurden und für ein Screening mit hochaffinen Antikörpern genutzt werden konnte.<sup>[323-324]</sup> Diese Methode hat sich allerdings nicht gegenüber anderen Druckmethoden für Peptide durchgesetzt. Es können beispielsweise Peptid-Arrays auf Mikrochips synthetisiert werden, bei denen sich die einzelnen Aminosäuren in kleinen, schmelzbaren Partikeln befinden. Diese lassen sich individuell in einem elektrischen Feld bewegen, das von Pixel-Elektroden generiert wird.<sup>[325]</sup> In einer ähnlichen Druckmethode, lassen sich Aminosäuresequenzen, nach Modifikation der Tonerkapazitäten eines gewöhnlichen Farblaserdruckers bis zu 5 µm genau auf festen Oberflächen drucken. So können etwa 160.000 Sequenzen in einem Array auf einer Fläche von 20 x 20 cm aufgebracht werden.<sup>[326]</sup>

Eine der ersten graphischen Codierungsmethoden für die Synthese von chemischen Bibliotheken stellt die Teebeutelmethode dar.<sup>[327]</sup> Die feste Matrix befindet sich hier in porösen Polypropylen-Beuteln, die durch einen Barcode markiert sind. Dieser wird bei jedem Umfüllen der Teebeutel im Verlauf der Split-and-Pool-Synthese durch einen Scanner ausgelesen, wodurch eine Rückverfolgung der Reaktionen und damit der Sequenz ermöglicht wird.<sup>[327]</sup> Eine chemische Codierung kann durch Bifunktionalisierung des Synthescharzes mit DNA gewährleistet werden, die parallel zur Synthese der Substanzbibliothek stattfinden kann.<sup>[328]</sup> Durch anschließendes Amplifizieren und Sequenzieren dieser DNA per PCR, können Hits aus Bibliotheken von Peptiden und Peptidomimetika komplementär zu biologischen Bibliotheken schnell und einfach auch mit kleinen Substanzmengen sequenziert werden.<sup>[328-329]</sup> Diese Methode kann mit einzelnen oder multiplen Radiofrequenzmarkierungen (*single or multiple adressable radiofrequency tag*; SMART<sup>™</sup>) zur „Radiofrequency Encoded Combinatorial Chemistry (REC<sup>™</sup>)“ kombiniert werden, was ein Auslesen der Sequenzen durch spektroskopische Verfahren ermöglicht.<sup>[330]</sup> Beim indirekten Isotopen-kodieren oder Massen-kodieren werden stabile Isotope (<sup>2</sup>H oder <sup>13</sup>C) als Kodierung in Linkermoleküle oder Bausteine der Bibliothek in bestimmten Verhältnissen eingefügt. Die resultierenden Isotopenmuster dienen bei der massenspektrometrischen Auswertung zur Strukturcharakterisierung.<sup>[331]</sup>

---

## 3 Zielsetzung

Im Mechanismus der Immunantwort auf eine Pathogeninvasion wird eine Migration von neutrophilen Granulozyten in das infizierte Gewebe durch CXCL8 induziert. Bei einer Reihe von chronisch entzündlichen Krankheiten und Autoimmunerkrankungen ist dieser Vorgang gestört und fälschlich induzierte Neutrophile können das Gewebe angreifen und zerstören. Es ist daher von großem Interesse, Inhibitoren für die Wechselwirkung zwischen CXCL8 und dessen korrespondierenden Rezeptoren auf Zelloberflächen zu entwickeln, um ihre Wirkungsweise zu verstehen und modulieren zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten bekannte Peptide und Peptoide, die die Wechselwirkung zwischen CXCL8 und seinem G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR1 inhibieren, modifiziert werden, um ihre Affinität zu erhöhen und Hypothesen zu ihrem Bindungsverhalten zu überprüfen. Basierend auf rationalem Design und Vorhersagen aus MD-Simulationen sollten sowohl Peptidvarianten entworfen werden, die im Gegensatz zum CXCL8 bindenden Ausgangspeptid keine Sekundärstruktur in Lösung aufweisen, als auch solche mit verringerter Flexibilität. Diese Peptide sollten synthetisiert, ihre Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie charakterisiert und deren Affinität zu CXCL8 durch Fluoreszenzanisotropie-Messungen bestimmt werden. Ziel war es, einen Zusammenhang zwischen geordneten Strukturen dieser Peptide und ihren Bindungseigenschaften zu überprüfen. Gleichzeitig sollte überprüft werden, inwiefern die Struktur dieser Liganden zur Stabilität gegenüber Proteasen beiträgt. Die Strategie der Makrozyklisierung zur Stabilisierung und Affinitätserhöhung sollte auch auf bekannte CXCL8 bindende Peptoide übertragen werden.

Ein weiteres wichtiges Vorgehen zur Generierung neuer Bindungspartner für Proteine sind die Synthese und das Screening von OBOC-Bibliotheken. Daher sollten Screeningprozesse, basierend auf Magnetseparation und Fluoreszenz etabliert werden, die in ihrer Durchführung einfach und vom Materialaufwand kosteneffizienter als die gängigen Strategien sind. Zur Evaluierung dieser Screeningmethoden sollten literaturbekannte an Streptavidin bindende Peptide mit einer Spanne unterschiedlicher Bindungsaffinitäten auf Syntheseharz immobilisiert und als Positivkontrollen verwendet werden. Diese Mini-Bibliothek sollte anschließend mit fluoreszent- und magnetisch markiertem CXCL8 behandelt werden, um Erkenntnisse über die detektierbare Affinität und mögliche Nebenreaktionen zu gewinnen. Abschließen sollte eine OBOC-Bibliothek von zyklischen Pentapeptoiden auf der festen Phase erstellt und mithilfe des so etablierten Magnetseparationsverfahrens auf CXCL8-Binder gescreent werden.

---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

---

### 4.1. Chemokin-Expression und -Charakterisierung

---

Für die Durchführung von Bindungsstudien und die Untersuchung von Protein-Ligand Wechselwirkungen, ist die Herstellung verschiedener Varianten des Zielproteins nötig. Für diese Arbeit wurden daher zwei verschiedene Varianten von CXCL8 exprimiert. Eine Isoform des humanen CXCL8 mit 72 Aminosäuren **1** (auch als IL8 oder CXCL8 wt bezeichnet)<sup>[332]</sup> und CXCL8S72C **2** (IL8-S72C, IL8Cys oder CXCL8Cys) eine Variante der humanen 72 Aminosäuren-Isoform bei der das C-terminale Serin durch ein Cystein ersetzt wurde. CXCL8 wt wurde sowohl für Fluoreszenzanisotropie-Bindungsstudien, als auch für Aktivitätsuntersuchungen an lebenden Zellen, wie den Transwell-Assay, eingesetzt. CXCL8S72C **2** eignet sich, aufgrund der gut zugänglichen Cystein-Seitenkette am C-Terminus, zur selektiven Markierung des Proteins, die in dieser Arbeit mit einem gelb fluoreszierenden Farbstoff Dylight-550<sup>[333]</sup> und mit Biotin vorgenommen wurde. Die erhaltenen Konjugate CXCL8-DL550 **3** und CXCL8-Biotin **4** wurden für Experimente an Synthescharzoberflächen und *One-Bead-One-Compound*-Substanzbibliotheken verwendet.

Für die Expression der beiden CXCL8-Varianten wurde ein modifiziertes Protokoll von Wiese *et al.*<sup>[332]</sup> angewandt. Dabei wurde das Plasmid pET-22b-IL8 bzw. pET-22b-IL8-S72C in *E. coli* BL21 (DE3) RIL verwendet. Der Expressionserfolg wurde über SDS-PAGE kontrolliert (vgl. Anhang Abbildung 8.1). Nach Lyse der Zellen wurde das Zelllysate im ersten Reinigungsschritt mittels Kationenaustauschchromatographie getrennt. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich das bei pH 7.4 stark positiv geladene CXCL8S72C (pI=8.3–9.5)<sup>[37, 53]</sup> von anionischen und ungeladenen Proteinen trennen (vgl. Anhang Abbildung 8.2). Mit den gesammelten Fraktionen wurde zur Identifizierung der Proteine eine SDS-PAGE durchgeführt. In Abbildung 4.1 ist zu sehen, dass in Fraktion 1-3 (Durchlauf) neben Proteinen verschiedener Größen auch Proteine in der Größenordnung von 8 kDa nachweisbar sind, was auf die Anwesenheit von CXCL8S72C **2** schließen lässt. In den Fraktionen 11-15 lassen sich 3 Proteinbanden detektieren. Die Bande bei etwa 8 kDa lässt sich dem CXCL8S72C Monomer (8.4 kDa) zuordnen. Mit etwa 15 kDa kann die zweite Bande dem bei der Lyse eingesetzten Lysozym (14.3 kDa) zugeordnet werden und die Bande bei ca. 17 kDa dem CXCL8S72C Dimer. Es wäre zu erwarten gewesen, dass das CXCL8S72C Dimer durch die Behandlung mit Mercaptoethanol und den Hitzeschritt in der Vorbereitung der SDS-PAGE Proben vollständig denaturiert wird. Ein Vorhandensein der Dimer Bande zeigt allerdings, dass die Denaturierungsbedingungen anscheinend nur für ein partielles Entfalten des Proteins gesorgt haben oder sich die Struktur teilweise wieder zurückfalten konnte.

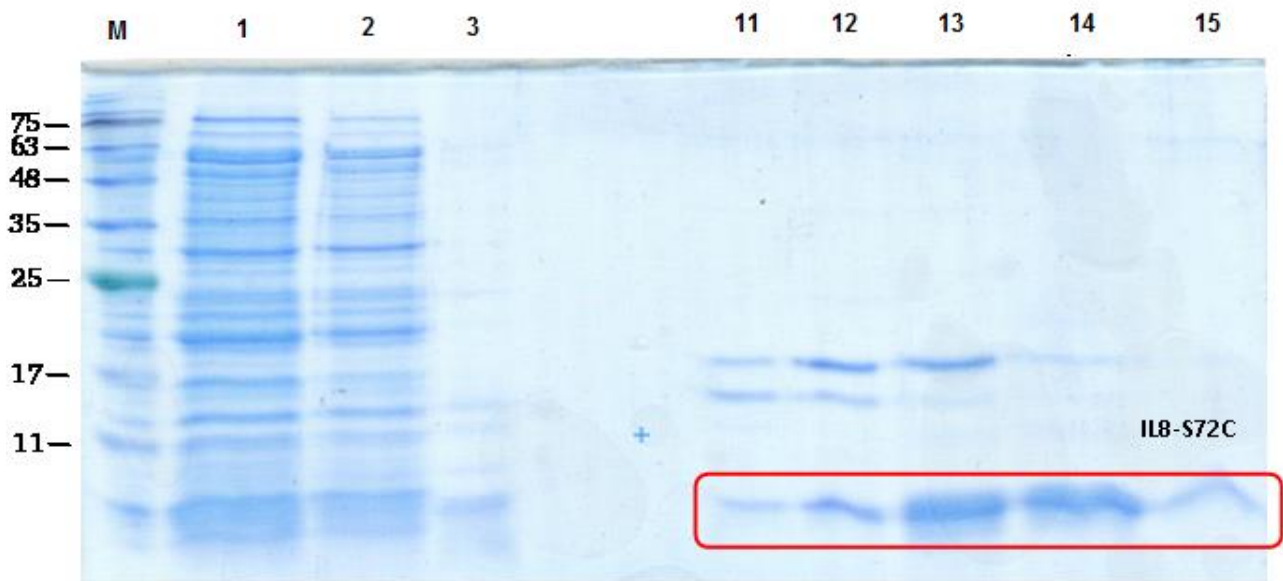


Abbildung 4.1: Exemplarische SDS-PAGE des durch Kationenaustauschchromatographie aufgereinigten Zelllysats bei der Expression von CXCL8S72C **2**. Fraktionen 1-3 enthalten anionische und ungeladene Proteine, die nicht oder nur wenig mit dem Säulenmaterial interagieren konnten. Fraktion 11-15 zeigt später eluierende Proteine unter denen auch CXCL8S72C **2** mit 8.4 kDa nachzuweisen ist.

Da CXCL8 wegen seiner GAG-Bindestelle eine Affinität zu Heparin aufweist, wurden die Fraktionen 11-15, in denen CXCL8S72C **2** enthalten war, miteinander vereinigt, in Puffer C mittels Zentricon umgepuffert und für den zweiten Reinigungsschritt auf eine FPLC Säule mit Heparin-Sepharose Matrix aufgetragen. Die Proteine wurden wieder in einem Gradienten mit steigender Salzkonzentration eluiert (vgl. Abbildung 4.2). Von den drei in den Fraktionen enthaltenen Proteinen konnte eines relativ gut vom Rest getrennt werden. Die Fraktionen 4-6 wurden durch SDS-PAGE analysiert, die in Abbildung 4.3 dargestellt ist. Das Gel zeigt, dass der Hauptteil der Verunreinigungen in Fraktion 4 enthalten ist, und sich CXCL8S72C **2** in den Fraktionen 5 und 6 angereichert hat. Es sind allerdings immer noch drei Proteinbanden in Fraktion 5 zu sehen, die den Hauptteil des CXCL8S72C **2** enthält.

In einem zusätzlichen Reinigungsschritt wurden Fraktion 5 und 6 miteinander vereinigt, auf Puffer C umgepuffert und mittels semipräparativer RP8-HPLC in einem Acetonitril-Gradienten aufgereinigt. Das Chromatogramm zeigt deutlich, dass CXCL8S72C **2** vollständig von allen anderen in der Lösung enthaltenen Proteinen getrennt werden konnte und zu 62.5% in der Probenlösung enthalten war (Abbildung 4.4). Nach Lyophilisieren des Eluats konnte das salzfreie Produkt gewogen werden. Die Ausbeute der Expression betrug 2.1 mg, was etwa 0.88 mg/L Expressionsansatz entspricht.

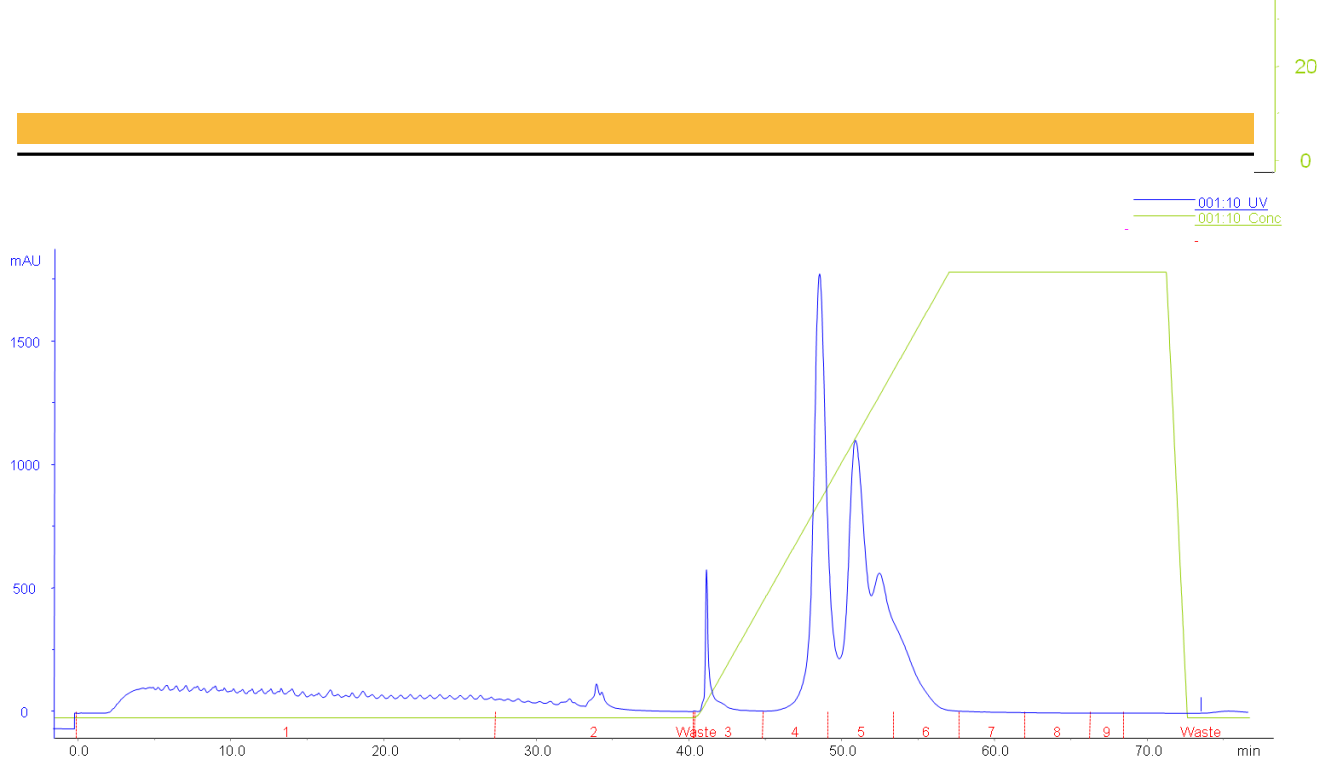


Abbildung 4.2: Exemplarisches Chromatogramm der Reinigung von CXCL8S72C 2 mittels Heparin-Affinitätschromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und automatisiert Fraktionen des Eluats gesammelt. Mit steigender Konzentration im Puffer B Gradienten (grün) werden die Proteine nach ihrer Bindungsstärke zur Heparin-Sepharose Matrix eluiert. Die Fraktionen 4-6 wurden für die weitere Aufreinigung gesammelt und sind hervorgehoben (rote Pfeile).

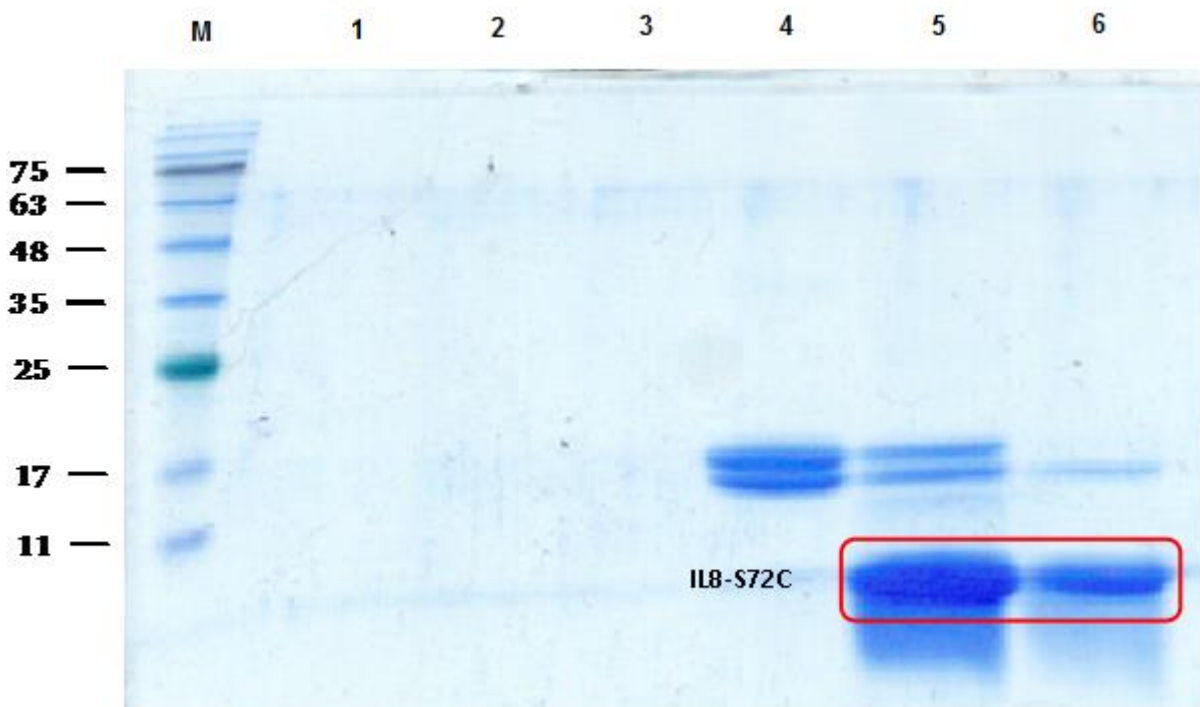


Abbildung 4.3: Exemplarische SDS-PAGE der durch Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteinlösung bei der Expression von CXCL8S72C 2. Fraktionen 1-3 zeigen keine Anwesenheit von Proteinen. In Fraktion 4 lässt sich der Hauptteil der noch vorhandenen Verunreinigungen finden. Fraktion 5 und 6 enthalten neben CXCL8S72C 2 (rot) noch Verunreinigungen



mAU

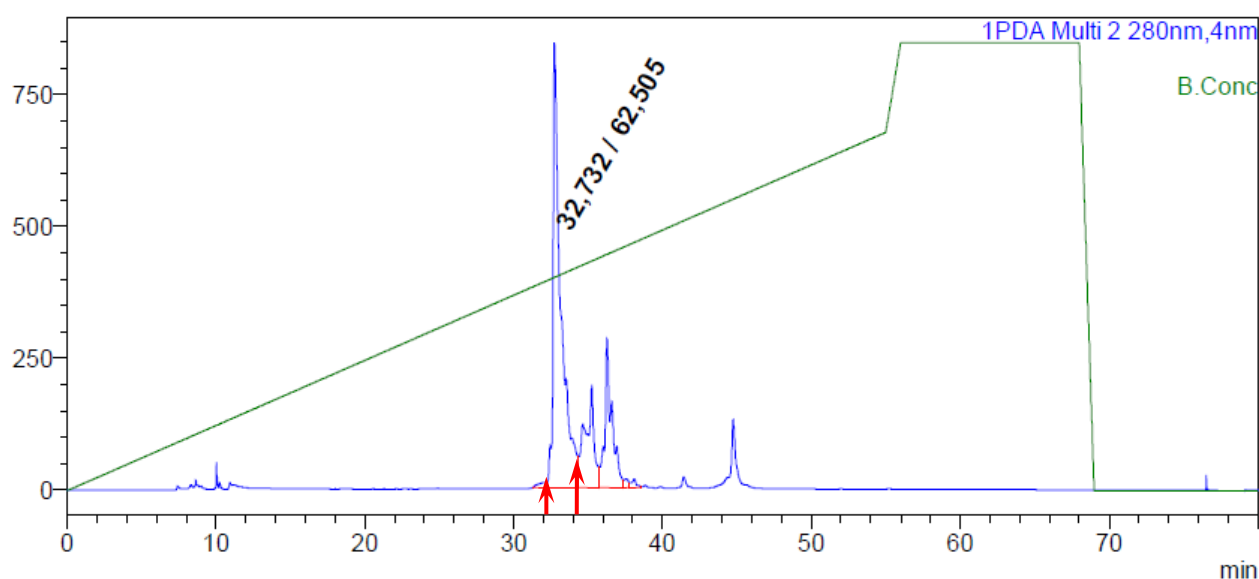


Abbildung 4.4: Exemplarisches Chromatogramm der semipräparativen RP C8-HPLC von CXCL8S72C 2. Die grüne Linie zeigt die Konzentration von Eluent B an. In blau ist die Absorption bei 280 nm gezeigt. Man erkennt, dass das Protein ausreichend von allen Verunreinigungen getrennt werden konnte. Die Retentionszeit für CXCL8S72C und die prozentuale Peakfläche als Maß für die Reinheit des Rohprodukts sind angegeben. Die gesammelte Fraktion ist hervorgehoben (rote Pfeile).

Für Bindungsstudien von CXCL8 mit Peptiden, peptomeren Liganden oder auch lebenden Zellen spielt die richtige Faltung des Proteins, die deren biologische Aktivität bestimmt, eine wichtige Rolle. Da IL8 ein CXC-Chemokin ist, besitzt es als CXCL8S72C 2 Variante 5 Cysteine. Es besteht also die Möglichkeit, dass sich die Disulfidbrücken falsch ausbilden und somit eine falsche Faltung und damit inaktives IL8 resultieren. Das Protein könnte auch durch das wiederholte Lösen und Lyophilisieren während der Reinigung oder durch die Wechselwirkungen an der hydrophoben stationären Phase der HPLC-Säule in eine falsche Faltung überführt werden. Durch Konjugation des C-terminalen Thiols mit Biotin und DyLight-550 könnte es ebenfalls zu einem Verlust der biologischen Aktivität durch Wechselwirkung der Markierung mit dem Protein selbst führen. Hinweise auf die Sekundärstruktur der wie oben beschrieben rekombinant hergestellten und gereinigten Proteine und deren Konjugate, wurden daher durch Circular dichroismus (CD) Spektroskopie und die biologische Aktivität durch einen Transwell-Assay nach Boyden<sup>[334]</sup> in vorangegangenen Arbeiten im Arbeitskreis untersucht und bestätigt.<sup>[3],[335],[336-337]</sup>

Für die Erstellung einer Protein-Stammlösung mit definierter Konzentration ist es Voraussetzung, dass eine genaue Bestimmung der Proteinkonzentration oder ein möglichst reines Endprodukt zum gravimetrischen Ansetzen der Stammlösung vorliegt. Bislang wurde die Konzentration des hergestellten Proteins mit dem BCA-Assay oder durch Messen der Absorption bei 280nm bestimmt. Beide Methoden wurden in vorangegangenen Arbeiten verglichen und zeigten eine Abweichung von etwa 80%.<sup>[3, 335]</sup> Da beim BCA-Assay für jeden Versuch eine eigene Kalibrierreihe erstellt werden muss, wird für diese Methode eine große Menge an Protein benötigt. Daher wurde Lysozym statt IL8 für die Kalibrierung eingesetzt, was allerdings durch die deutlich unterschiedliche Verteilung der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Cystein in beiden Proteinen

---

fehlerbehaftet ist. Für die Absorptionsmessung bei 280nm muss laut Lambert-Beer-Gesetz die Schichtdicke der Messprobe konstant gehalten werden. Die Schichtdicke wird durch Ausbildung eines Meniskus an der Oberfläche der Lösung beeinflusst, der wiederum durch die Viskosität der Lösung und damit auch durch die Konzentration von Proteinen und Salzen in der Lösung. Beide Methoden sind unspezifisch und können so das gewünschte Protein nicht von Verunreinigungen durch andere Proteine unterscheiden, was zu verfälschten Ergebnissen führt. Anhand der SDS-PAGE konnten das Protein und die enthaltenen Verunreinigungen im Lysat, sowie nach der Kationenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie nachgewiesen werden.

Fehlgefaltete und somit hydrophobere Varianten des Proteins CXCL8S72C 2, sowie Verunreinigungen durch unerwünschte Proteine, wie das zur Lyse eingesetzte Lysozym, und Salze des eingesetzten Puffers konnten jedoch anschließend vollständig vom Endprodukt durch RP-Chromatographie getrennt werden (vgl. Abbildung 4.4). Dies ermöglichte ein genaues Einwiegen des aktiven Proteins für eine Stammlösung als Grundlage für die folgenden Experimente.



---

## 4.2. Rationales Design von CXCL8 bindenden Peptidomimetika

---

Zu Teilen des Kapitels 4.2 wurden bereits Arbeiten veröffentlicht.<sup>[3, 227, 338]</sup>

Eine Herangehensweise zur Entwicklung von Chemokininhibitoren basiert auf der Informationen über die Chemokin-Rezeptor-Wechselwirkung. Durch Orientierung an bereits vorhandenen Inhibitoren oder deren Sequenz oder Struktur ist ein rationales Design möglich. Für die Interaktion von CXCL8 mit seinem Rezeptor CXCR1 wird angenommen, dass es sich um einen 2-Bindungsstellen Mechanismus handelt (vgl. Kapitel 2.1.1).<sup>[339-340]</sup> Die flexible CXCL8 N-Schleifen Region interagiert dabei mit dem CXCL8 N-Terminus (Stelle 1) und wird darauf folgend der zweiten Bindungsstelle an den extrazellulären Domänen 3 und 4 (ECD3 und ECD4) präsentiert. Hier interagiert das ELR-Motiv des CXCL8 N-Terminus, bestehend aus Glutaminsäure, Leucin und Arginin, mit ECD3 und ECD4 des Rezeptors (vgl. Abbildung 2.3).<sup>[77, 341-342]</sup> Für die Interaktion und die Rezeptoraktivierung sind die Aminosäuren R199, R203 und D265 von CXCR1 von Bedeutung.<sup>[71-72]</sup> Obwohl es keine direkten experimentellen Beweise für die Interaktion des ELR-Motivs mit den ECDs des Rezeptors gab, konnten Helmer *et al.* durch ein flexibles *protein-protein docking* mit im Kraftfeld ROSETTA ein Homologiemodell erstellen und die für eine Interaktion dieser beiden Regionen bestätigen.<sup>[3, 48, 227, 343]</sup> Dieses Modell ergab als hauptsächliche Interaktionsregionen von CXCL8 die N-Schleife, die 3<sub>10</sub>-Helix, 40S-Schleife und den  $\beta_3$ -Strang, was mit experimentellen Daten übereinstimmte.<sup>[48, 344]</sup> Die Interaktion der Reste R199, R203 aus ECD3 und D265 aus ECD4 von CXCR1 mit CXCL8 wurde durch dieses Modell untersucht abgebildet. Ein Peptid auf Grundlage der relevanten Reste aus ECD3 und ECD4 könnte somit eine Affinität zu CXCL8 besitzen. Es wurden Ausschnitte der Sequenzen dieser beiden extrazellulären Domänen (A196-I204 und A264-Q271) ausgewählt, die diese Reste und jeweils eine komplette Helixwindung enthalten. Diese beiden Peptide wurden mit einem Aminohexansäure-(Ahx)-Linker verknüpft, der bereits in analogen Arbeiten mit dem CXCR1 N-Terminus einen guten Kompromiss zwischen Hydrophobizität, Flexibilität und Länge bewiesen hatte.<sup>[224, 227]</sup> Das resultierende Peptid AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ wurde „IL8RPLoops“ genannt, nach einem Standard-Fmoc/tBu-Peptidfestphasensyntheseprotokoll synthetisiert und am N-Terminus mit Fluorescein markiert (siehe Kapitel 6.5.2).<sup>[227, 345]</sup>

In ersten Versuchen war ein Peptid synthetisiert worden, das Affinität zu CXCL8 zeigte und diverse biologische Antworten auf CXCL8 inhibierte. Es wurde durch MD-Simulationen<sup>5</sup> gezeigt, dass beide Seiten des Peptids helikale Strukturen, ähnlich wie beim Rezeptor, ausbilden. Nach erneuter Synthese konnte in Fluoreszenzanisotropiemessungen allerdings keine Affinität von Fluo-IL8RPLoops zu CXCL8 bestimmt werden (Abbildung 4.5).

---

<sup>5</sup> Durchgeführt von James A. R. Dalton, Laboratory of Molecular Neuropharmacology and Bioinformatics, Universitat Autònoma de Barcelona

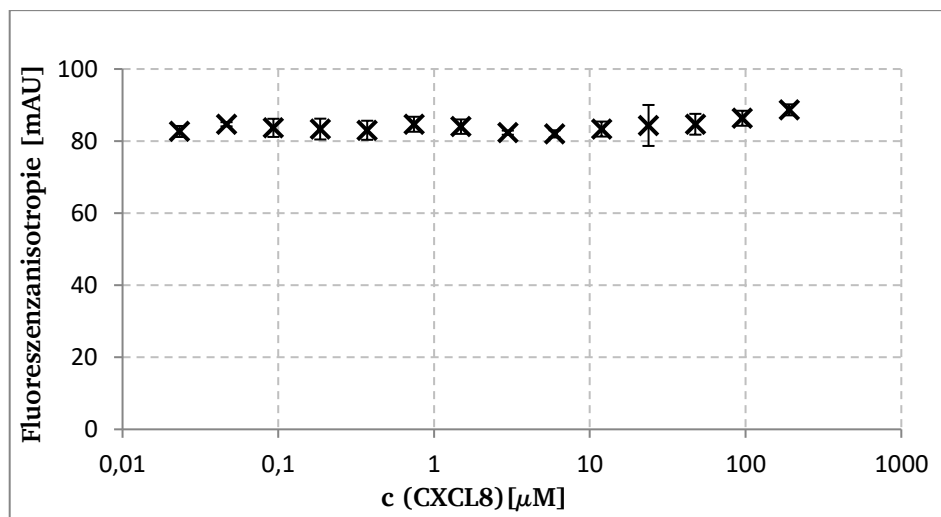


Abbildung 4.5: Exemplarische Fluoreszenzanisotropiemessung von Fluo-IL8RPLoops mit CXCL8. Es konnte keine Bindung im betrachteten Konzentrationsbereich festgestellt werden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachmessung an.

Bei neuen MD-Simulationen<sup>6</sup> stellte sich heraus, dass die Struktur des Peptids nicht, wie durch die Experimente von Helmer und den MD-Simulationen von Dalton vorhergesagt, auf beiden Seiten des Ahx-Linkers jeweils eine ganze Helixwindung enthält, was im Rezeptor CXCR1 aber der Fall ist. IL8RPLoops zeigte statt der erwarteten, dem nativen Rezeptorbereich ähnlichen Struktur in der Simulation eine ungeordnete Struktur und eine leichte Neigung dazu  $\beta$ -Stränge zu bilden. Die helikalen Bereiche des Peptids hingegen sind nicht stabil (siehe Abbildung 4.6).

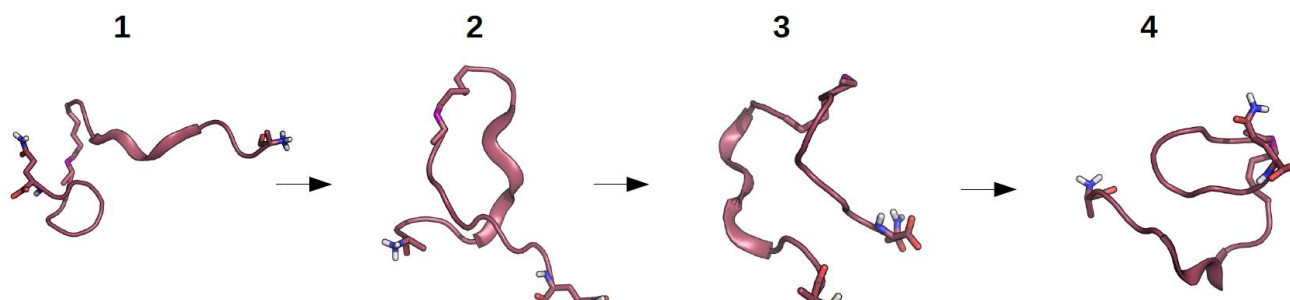


Abbildung 4.6: MD Simulation von IL8RPLoops an vier verschiedenen Zeitpunkten (von links nach rechts: 20 ns, 35 ns, 80 ns, 100 ns) zeigt eine stark fluktuierende Konformation. Helikale Strukturelemente werden präferiert im N-terminalen Teil des Peptids gebildet, gehen aber im Laufe der Simulation verloren, wodurch ein größtenteils ungeordnetes Peptid entsteht.

Zur Strukturvorhersage von Proteinen ist der Chou-Fasman-Algorithmus eine weit verbreitete statistische Methode, die auf empirischen Werten beruht.<sup>[346-349]</sup> Jeder Aminosäure der Sequenz wird dabei ein Wert zugeordnet, der ein Maß für die Wahrscheinlichkeit ist, dass der Rest in einer  $\alpha$ -helikalen Struktur ( $P_\alpha$ ) oder in einem  $\beta$ -Faltblatt ( $P_\beta$ ) vorliegt. Bei einem  $P_\alpha$  von  $> 100$  in 4 von 6 aufeinander folgenden Resten liegt eine Nukleationsstelle für  $\alpha$ -Helices vor. Das Fenster von 6 Aminosäuren wird in beide Richtungen der Kette verschoben, bis vier aufeinander folgende Reste ein mittleres  $P_\alpha < 100$

<sup>6</sup> Durchgeführt von Sven Jager, Computational Biology and Simulation, TU Darmstadt

aufweisen und so eine Abbruchsequenz und damit das Helixende bilden. Besteht dieses Fenster zwischen Nukleations- und Abbruchsequenz aus mehr als 5 Aminosäuren und ist  $P_\alpha > P_\beta$  liegt hier eine  $\alpha$ -Helix vor. Für  $\beta$ -Faltblatt-Motive müssen 3 von 5 Resten ein  $P_\beta > 100$  aufweisen, es wird hier analog zur Bestimmung von  $\alpha$ -Helices weiter verfahren. Mit Hilfe dieses Algorithmus lassen sich also 3-6 Aminosäuren lange Nukleationsstellen für Sekundärstrukturen in Peptidsequenzen erkennen, die durch Ausbreitung entlang des Peptidrückgrats in beide Richtungen bis zu einer Abbruchsequenz eine Vorhersage über Sekundärstrukturen zulassen.

Wird dieser Algorithmus auf die Sequenz von IL8RPLoops angewandt, zeigt sich, dass die beiden durch Amino-hexansäure (Ahx) getrennten Teile des Peptids stark zur Ausbildung von  $\alpha$ -Helices tendieren sollten, da über die komplette Sequenz die Regeln zur  $\alpha$ -Helix Nukleation erfüllt sind und keine helixbrechenden Sequenzen enthalten sind. Allerdings ist ausgehend vom C-Terminus des Peptids ebenfalls die Möglichkeit gegeben, dass sich  $\beta$ -Stränge bilden können, die in Richtung des N-Terminus mit Abbruchsequenzen überlappen und aufgelöst werden.

	A	K	W	R	M	V	L	R	I	Ahx	A	D	T	L	M	R	T	Q
$P_\alpha$	142	114	108	98	145	106	121	98	108	-	142	101	83	121	145	98	83	111
+	→										-	→						
-											-							
$P_\beta$	83	74	137	93	105	170	130	93	160	-	83	54	119	130	105	93	119	110
+	←										-	←						
-											-							

Abbildung 4.7: Sequenz von IL8RPLoops mit den dazugehörigen Chou-Fasman-Parametern für die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von  $\alpha$ -Helices ( $P_\alpha$ ) und  $\beta$ -Faltblättern ( $P_\beta$ ). In grün sind die Sequenzabschnitte für mögliche Nukleationsstellen angegeben und in orange Abbruchsequenzen für die dazugehörige Sekundärstruktur. Die grauen Pfeile geben die Richtung an, in der sich die Sekundärstrukturen ausbreiten.

In Abbildung 4.7 ist die Sequenz von IL8RPLoops mit zugehörigen Chou-Fasman Parametern und den möglichen  $\alpha$ -helikalen und  $\beta$ -Faltblatt-Regionen, sowie Abbruchsequenzen der Sekundärstrukturen aufgezeigt. Bei Betrachtung des C-Terminus von IL8RPLoops und Vergleich der Chou-Fasman-Parameter fällt auf, dass die C-terminale Sequenz bestehend aus den Aminosäuren LMRTQ nur ein  $P_\alpha - P_\beta$  von 1 und damit keine signifikante Tendenz zur Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix ausgehend vom C-Terminus aufweist. Wird der Sequenzausschnitt noch um eine Position erweitert, liegt die Parameterdifferenz für TLMRTQ sogar bei -35. Dies könnte an dieser Stelle zu einer bevorzugten  $\beta$ -Strang-Struktur führen und somit die Instabilität der  $\alpha$ -helikalen Anteile des Peptids und den strukturellen Unterschied von IL8RPLoops in den durchgeführten MD Simulationen erklären. Um das gemittelte  $P_\alpha$  dieses Sequenzabschnitts zu erhöhen und damit bevorzugt eine  $\alpha$ -Helix auszubilden, kann eine Aminosäure ausgetauscht werden. Der Austausch des C-terminalen Glutamins durch eine Glutaminsäure bietet sich dabei an, da hier mit dem Austausch des Säureamids gegen die Carbonsäure nur eine minimale strukturelle Änderung gegenüber dem Wildtyp erreicht wird. Dieses Glutamin entspricht Q271 des Rezeptors CXCR1 und es konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, dass dieser Rest für eine Bindung mit CXCL8 essentiell ist. Damit ist er potentiell für einen Austausch geeignet. Da Glutaminsäure den höchsten  $P_\alpha$  (151) und gleichzeitig niedrigsten  $P_\beta$  (37) aller natürlichen Aminosäuren besitzt, sollte es durch den Austausch zu einer Stabilisierung der  $\alpha$ -helikalen Struktur des Peptids kommen. Im Folgenden werden die beiden Peptide als IL8RPLoopsQ 5 und IL8RPLoopsE 6 bezeichnet.

	A	K	W	R	M	V	L	R	I	Ahx	A	D	T	L	M	R	T	E
P <sub>α</sub>	142	114	108	98	145	106	121	98	108	-	142	101	83	121	145	98	83	151
+											-							
-											-							
P <sub>β</sub>	83	74	137	93	105	170	130	93	160	-	83	54	119	130	105	93	119	37
+										-								
-										-								

Abbildung 4.8: Sequenz von IL8RPLoopsE 6 mit den dazugehörigen Chou-Fasman-Parametern für die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von  $\alpha$ -Helices (P<sub>α</sub>) und  $\beta$ -Strängen (P<sub>β</sub>). In grün sind die Sequenzabschnitte für mögliche Nukleationsstellen angegeben und in orange Abbruchsequenzen für die dazugehörige Sekundärstruktur. Die grauen Pfeile geben die Richtung an, in der sich die Sekundärstrukturen ausbreiten.

In Abbildung 4.8 ist die Sequenz von IL8RPLoopsE 6 mit zugehörigen Chou-Fasman-Parametern und den möglichen  $\alpha$ -helikalen und  $\beta$ -strängigen Regionen, sowie Abbruchsequenzen der Sekundärstrukturen aufgezeigt. Durch das Einführen der Glutaminsäure in der zweiten Hälfte des Peptids wurde eine weitere Abbruchsequenz für  $\beta$ -Stränge erzeugt und der  $\alpha$ -helikale Charakter der Kette verstärkt. Um die Strukturen der beiden Peptide zu bestätigen, wurden sowohl in Kooperation mit dem AK von Prof. Hamacher MD-Simulationen<sup>7</sup> der beiden Sequenzen durchgeführt und das Auftreten der Sekundärstrukturelemente über die Zeit gemittelt, als auch CD-Spektren der Peptide aufgenommen.<sup>8</sup> Wie in Abbildung 4.9 gut zu erkennen ist, wurde durch die eingefügte Mutation der  $\alpha$ -helikale Anteil des Peptids stark erhöht, während der ungeordnete Charakter der Sequenz etwas zurückging. Die CD-Spektren zeigen ein Minimum bei 201 nm, was auf eine *random coil*-Struktur hinweist. Eine Schulter bei etwa 222 nm deutet auf eine  $\alpha$ -helikale Struktur hin, die nur bei Fluo-IL8RPLoopsE 7 zu beobachten ist (Abbildung 4.10).

<sup>7</sup> Durchgeführt von Sven Jäger, AK Hamacher, TU Darmstadt.

<sup>8</sup> Betreut und durchgeführt von Philipp Czechowski, AK Reggelin, TU Darmstadt.

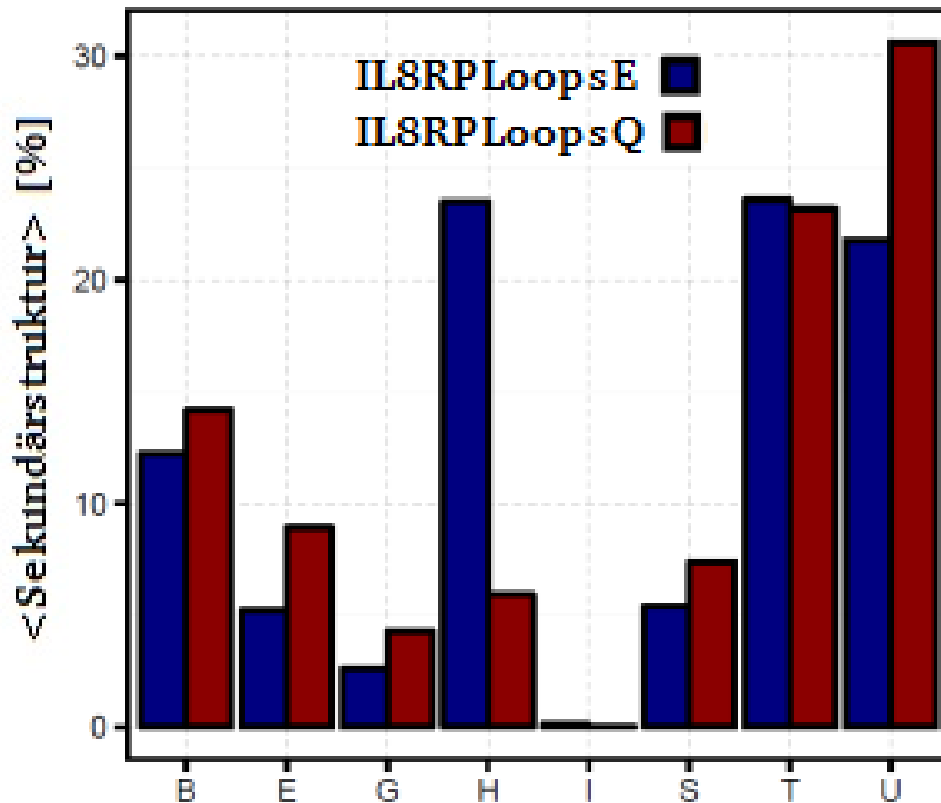


Abbildung 4.9: Aus MD-Simulationen berechnete durchschnittliche Anteile von Sekundärstrukturelementen von IL8RPLoopsQ **5** (rot) und IL8RPLoopsE **6** (blau). B =  $\beta$ -Stränge, E = ausgedehnter Strang, G =  $3_{10}$ -Helix, H =  $\alpha$ -Helix, S = Biegung, T = Wasserstoffbrücken-Windung, U = ungeordnete Struktur. Es ist klar zu erkennen, dass IL8RPLoopsE **6** im Vergleich zu IL8RPLoopsQ **5** einen größeren Anteil an  $\alpha$ -Helices aufweist.

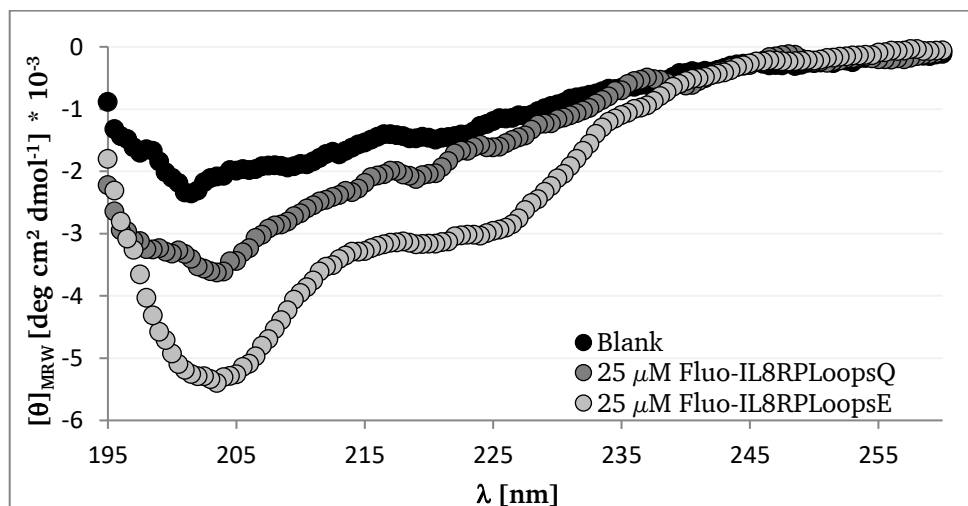


Abbildung 4.10: CD-Spektrum von Fluo-IL8RPLoopsQ **8** und Fluo-IL8RPLoopsE **7**. Das Minimum bei 201 nm zeigt eine ungeordnete Struktur in beiden Peptiden an, während die Schulter bei 222 nm auf  $\alpha$ -helikale Strukturen hindeutet, die nur in Fluo-IL8RPLoopsE **7** auftreten. Fluo-IL8RPLoopsE **7** wurde von Dr. Dorothea Helmer synthetisiert und die Messdaten des Spektrums bereits in anderen Arbeiten veröffentlicht.<sup>[3, 227]</sup>

Um ein besseres Verständnis der Stabilität und der Fluktuationen in der Struktur von IL8RPLoopsE 6 zu gewinnen, wurden aus den Daten der MD-Simulation die durchschnittlichen Distanzen beider Peptidtermini ( $C_{\alpha}$  K2 –  $C_{\alpha}$  E18/Q18)) von IL8RPLoopsE 6 und IL8RPLoopsQ 5 berechnet.<sup>9</sup> Dabei war zu beobachten, dass der positiv geladene Rest K2 des Peptids IL8RPLoopsE 6 offenbar mit dessen C-Terminus und dem negativ geladenen Rest E18 wechselwirkt und so der Abstand der Termini über die Zeit der Simulation konstant bleibt. Es kann daraus geschlossen werden, dass durch diese Strukturstabilisierung, für IL8RPLoopsE 6 eine zyklische Konformation begünstigt wird. Im Gegensatz dazu fluktuiert der Abstand von N- zu C-Terminus von IL8RPLoopsQ 5 aufgrund der fehlenden Stabilisierung sehr stark, was auf eine hohe Flexibilität des Peptids hindeutet, während dieser Abstand bei IL8RPLoopsE 6 im Verlauf der gesamten Simulationszeit von 100 ns stabil bleibt (siehe Abbildung 4.11).

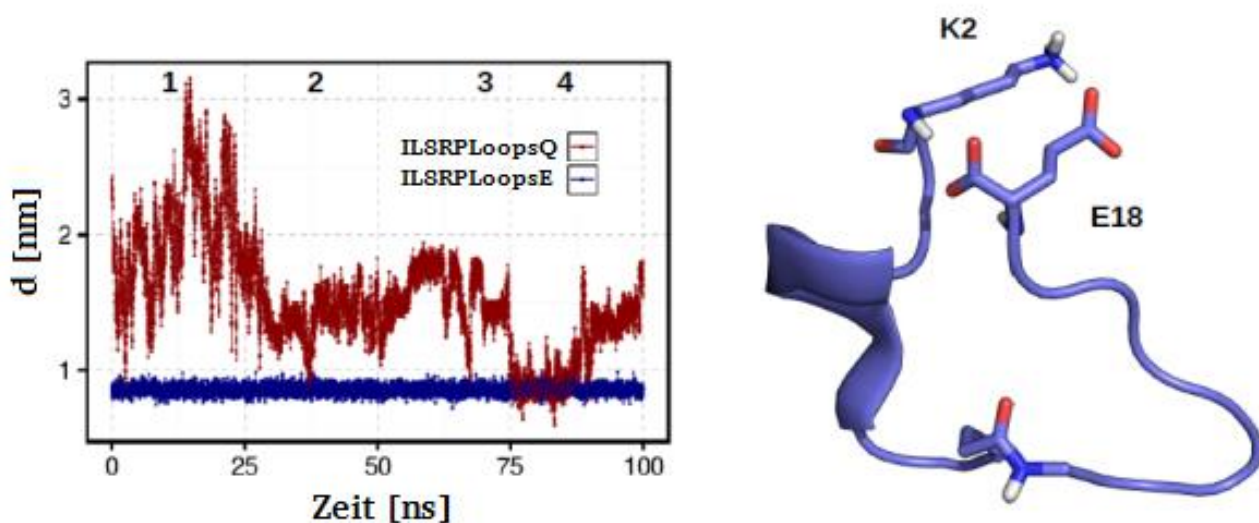


Abbildung 4.11: MD-Simulation von IL8RPLoopsQ 5 (rot) und IL8RPLoopsE 6 (blau). Die Auftragung der Terminiabstände der Peptide über die Simulationszeit (links) zeigt, dass IL8RPLoopsQ 5 stark in seiner Struktur fluktuiert, während IL8RPLoopsE 6 eine stabile ringförmige Struktur aufweist (rechts). Dies kann auf elektrostatische Wechselwirkungen der Peptidtermini zurückgeführt werden.

<sup>9</sup> Durchgeführt von Sven Jager, AK Hamacher, TU Darmstadt.

Durch Auftragen der *root-mean-square deviation* (RMSD) Werte beider Peptide über die Simulationszeit als ein Maß für die strukturellen Fluktuationen über das gesamte Peptid und Betrachtung der Wahrscheinlichkeitsdichte aufgetragen gegen die *root-mean-square fluctuation* (RMSF), die ein Maß für die Abweichung einer Position von ihrer Referenzposition über die Zeit ist, konnte ein Flexibilitätsverlust anhand der RMSF Werte unter 0.2 bei IL8RPLoopsE 6 bestätigt werden (siehe Abbildung 4.12).

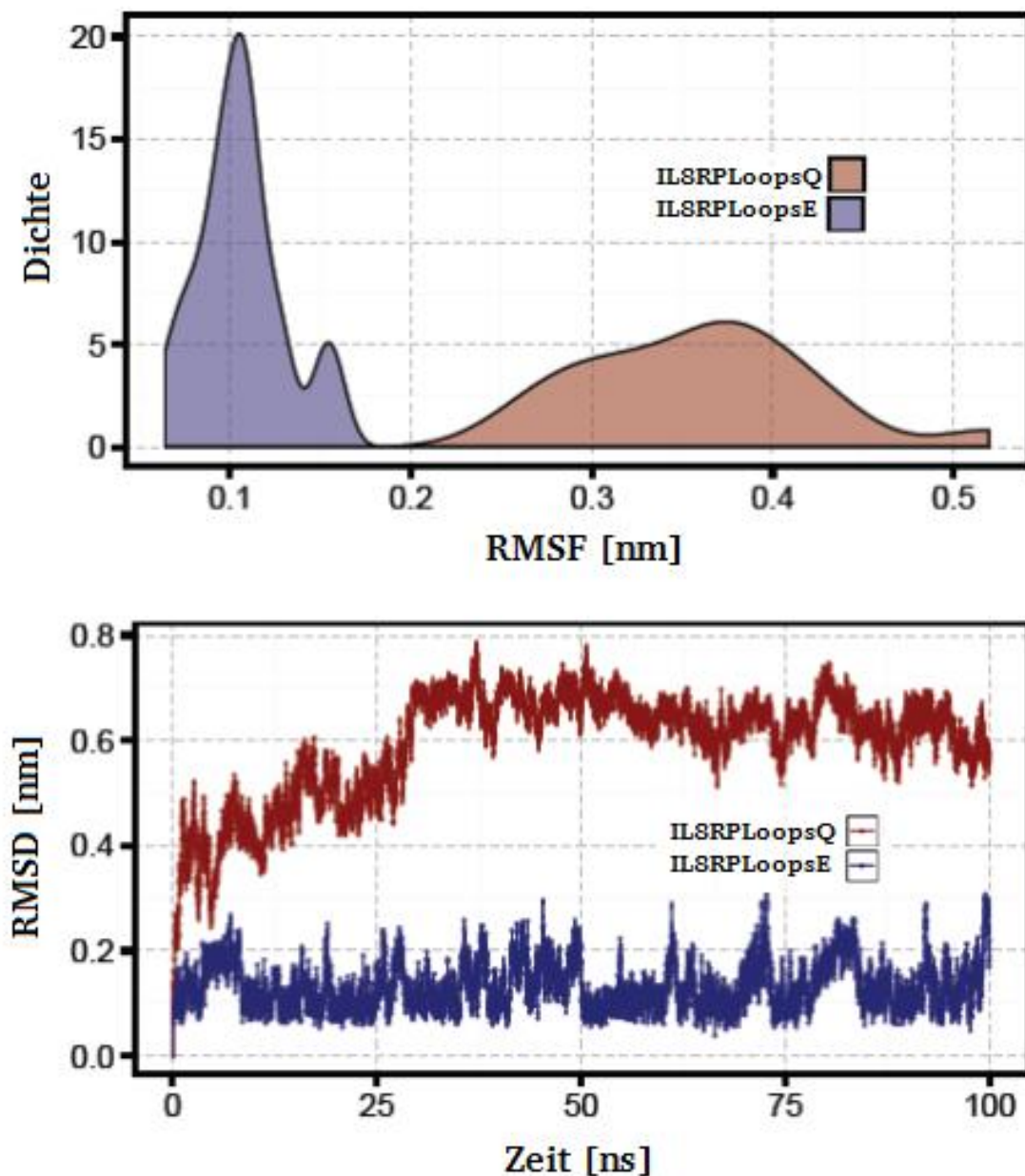


Abbildung 4.12: Vergleich der RMSF und RMSD der MD-Simulationen von IL8RPLoopsQ 5 (rot) und IL8RPLoopsE 6 (blau). Die RMSF von IL8RPLoopsE 6 und IL8RPLoopsQ 5 als Dichteverteilung (oben) und die RMSD über die Simulationszeit (unten) zeigen, dass das Rückgrat von IL8RPLoopsE 6 wesentlich eingeschränkter in seiner Beweglichkeit ist als das von IL8RPLoopsQ 5.



Die Messung der Bindung der beiden Peptide an CXCL8 mittels Fluoreszenzanisotropie zeigte, dass die stabilisierte Struktur von Fluo-IL8RPLoopsE **7** gegenüber Fluo-IL8RPLoopsQ **8** zu einer Erhöhung der Affinität des Peptids führt (Abbildung 4.13). Fluo-IL8RPLoopsE **7** zeigt bei der Bindung mit CXCL8 dabei eine Dissoziationskonstante  $K_d = 1.12 \pm 0.14 \mu\text{M}$ .

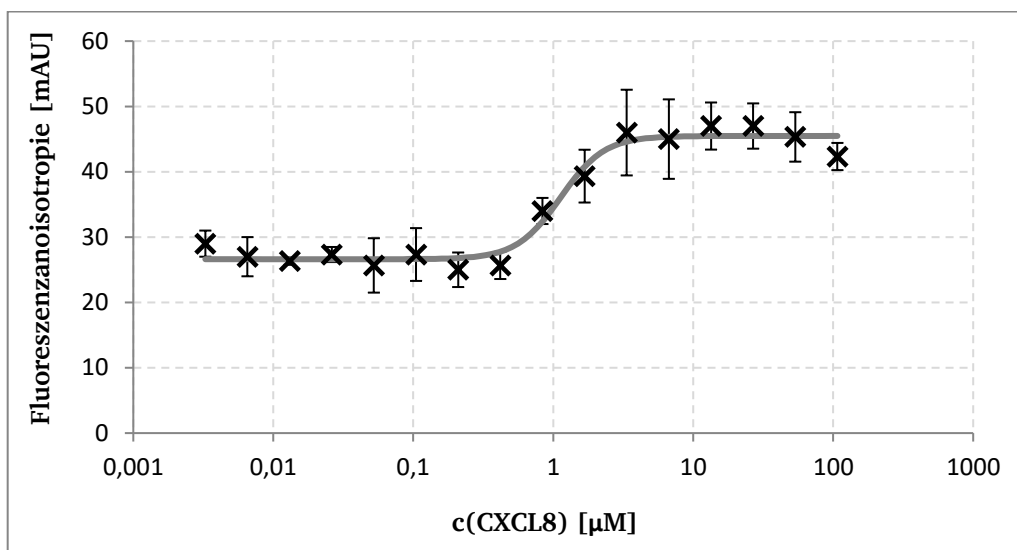


Abbildung 4.13: Fluoreszenzanisotropiemessung von Fluo-IL8RPLoopsE **7** mit CXCL8. Die Auswertung erfolgte in OriginsPro 8 über die Hill-Gleichung mit  $n=1$ .  $K_d = 1.12 \pm 0.14 \mu\text{M}$ . Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachmessung an.

#### 4.2.1. Einfluss der Struktur von IL8RPLoops auf die Bindung mit CXCL8

In den simulierten Strukturen der beiden Peptide IL8RPLoopsQ **5** und IL8RPLoopsE **6** gibt es sowohl Unterschiede in der Orientierung der beiden Peptidtermini, als auch in der Sekundärstruktur. IL8RPLoopsE **6** weist dabei eine zyklische Struktur (vgl. Abbildung 4.11) und einen erheblichen Anteil an helikalen Strukturelementen (vgl. Abbildung 4.9) auf, wohingegen IL8RPLoopsQ **5** eine ungeordnete Struktur mit Tendenz zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturelementen einnimmt.

Um den Einfluss der helikalen Sekundärstruktur des Peptids auf die Affinität zu CXCL8 untersuchen zu können, wurden einzelne Peptoidbausteine in die Sequenz von IL8RPLoopsE **6** eingefügt. Dabei wird die Seitenkette an der entsprechenden Stelle der Sequenz beibehalten aber gleichzeitig die Fähigkeit zur Ausbildung von Sekundärstrukturen durch die höhere Flexibilität und die fehlende Möglichkeit des Peptoidrückgrats, über N-H-Gruppen Wasserstoffbrücken auszubilden, unterdrückt. Um lediglich den Einfluss der  $\alpha$ -Helix auf die Affinität des Peptids untersuchen zu können, musste darauf geachtet werden, dass keine für die Bindung mit CXCL8 essentielle Aminosäure ausgetauscht wurde. In der vorrangegangenen Arbeit von Helmer *et al.* wurden bei einem Protein-Protein Docking des CXCR1 Rezeptors mit CXCL8 Voraussagen über für die Bindung wichtige Reste gemacht, indem die Distanzen für Wasserstoffbrückenbindungen gemessen wurden.<sup>[3, 227]</sup> Distanzen zwischen Donor- und Akzeptoratomen sollten dabei unter  $3.9 \text{ \AA}$ , aber idealerweise zwischen  $2.7 \text{ \AA}$  und  $2.9 \text{ \AA}$  liegen, um die Ausbildung starker H-



Brücken zu gewährleisten.<sup>[350-352]</sup> Diese Messung identifizierte die Reste R199, R203, D265, T266, L267, R269 und T270 als mögliche interagierende Aminosäuren, von denen R199, R203 und D265 bereits in früheren Arbeiten experimentell bestätigt worden waren.<sup>[71, 341]</sup> Mit Ausnahme von L267 besitzen diese Aminosäuren alle einen  $P_{\alpha} \leq 100$  und sind damit vermutlich nicht für die Bildung von  $\alpha$ -Helices ausschlaggebend.

Tabelle 4.1: Sequenz von IL8RPLoopsE 6 mit den dazugehörigen Chou-Fasman-Parametern für die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von  $\alpha$ -Helices ( $P_{\alpha}$ ). Aminosäuren, die für die Bindung mit CXCL8 als wichtig eingeschätzt werden, sind orange markiert. In grün wurden die stärksten Helixbildner ( $P_{\alpha} \leq 120$ ) hervorgehoben. Die mit x markierten Aminosäuren wurden für den Austausch durch einen analogen Peptoidbaustein ausgewählt.

	A	K	W	R	M	V	L	R	I	Ahx	A	D	T	L	M	R	T	E
$P_{\alpha}$	142	114	108	98	145	106	121	98	108	-	142	101	83	121	145	98	83	151
	x				x		x				x			x	x			

Die in Tabelle 4.1 markierten Aminosäuren A1, M5, L7, A11, L14, und M15 wurden für den Austausch mit Peptoidbausteinen ausgewählt, um von E18 unabhängig den Einfluss der  $\alpha$ -helikalen Struktur auf die Bindung von IL8RPLoopsE 6 mit CXCL8 zu untersuchen. Die sechs Peptomere wurden nach einem Standard-Fmoc/tBu-Peptidfestphasensyntheseprotokoll synthetisiert und am N-Terminus mit Fluorescein markiert (siehe Kapitel 6.5.2).<sup>[227, 345]</sup> Dabei wurde an der jeweiligen Position des Aminosäureaustauschs das zur Seitenkette analoge primäre Amin durch die Submonomermethode eingefügt.<sup>[271]</sup> Um den Einfluss der Mutationen auf die Strukturen der hergestellten Peptomere zu untersuchen, wurden CD-Spektren der Peptomere aufgenommen.<sup>10</sup> Die Spektren zeigen, wie zu erwarten, ein Minimum bei 201 nm, was auf ungeordnete Strukturen hinweist. Eine Schulter bei etwa 222 nm würde auf  $\alpha$ -Helices hindeuten, bleibt aber bei allen Mutationen aus (Abbildung 4.14). Es wird daher angenommen, dass die hergestellten Peptomere tatsächlich keine  $\alpha$ -helikalen Strukturen mehr aufweisen.

<sup>10</sup> Betreut und durchgeführt von Philipp Czechowski, AK Reggelin, TU Darmstadt

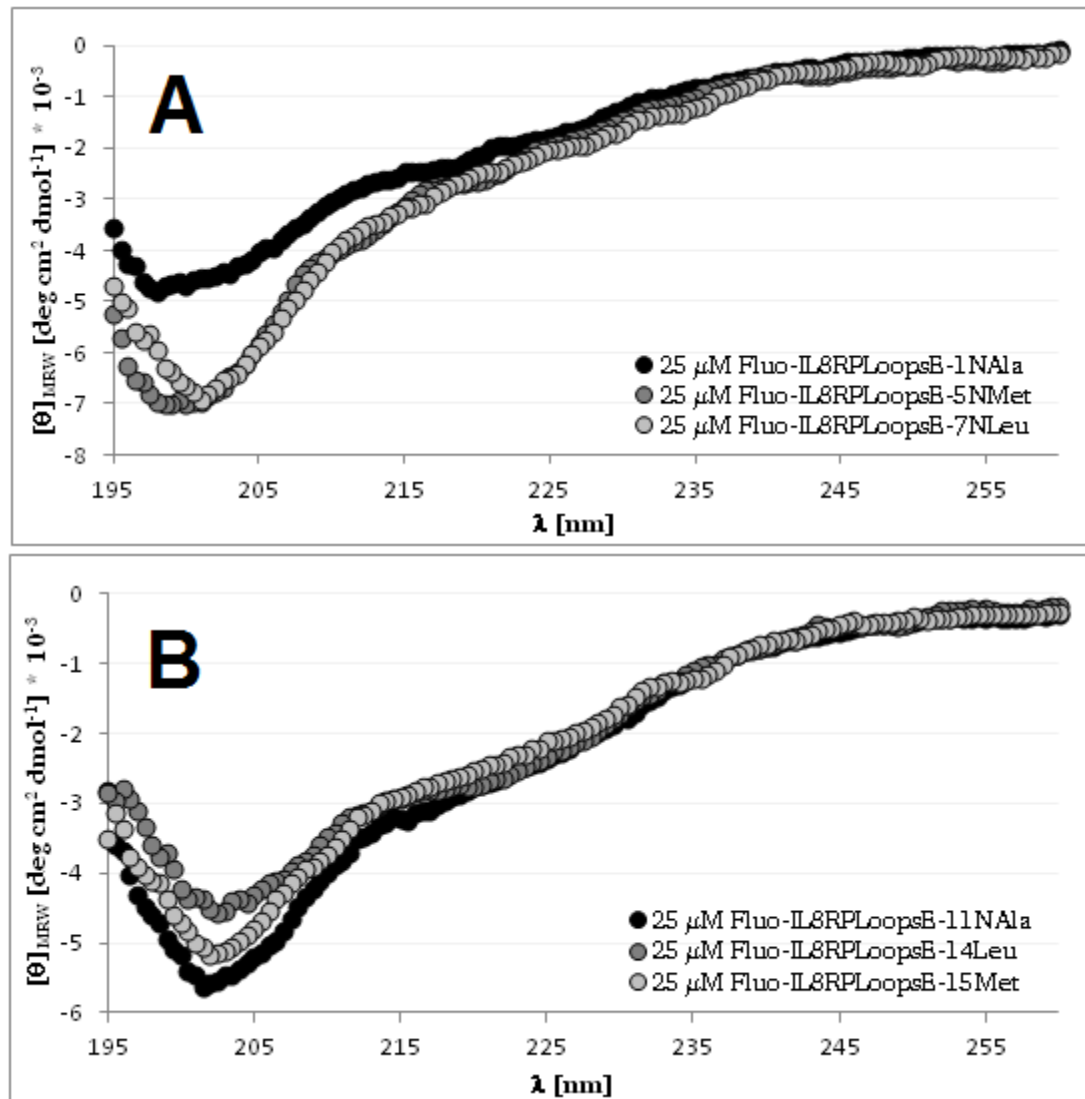


Abbildung 4.14: A: CD Spektrum von Fluo-IL8RPLoopsE-1NAla **9**, Fluo-IL8RPLoopsE-5NMet **10** und Fluo-IL8RPLoopsE-7NLeu **11**.

B: CD Spektrum von Fluo-IL8RPLoopsE-11NAla **12**, Fluo-IL8RPLoopsE-14NLeu **13** und Fluo-IL8RPLoopsE-15NMet **14**.

Das Minimum bei 201 nm zeigt eine ungeordnete Struktur in den Peptomeren an, während eine Schulter bei 222 nm, die auf  $\alpha$ -helikale Strukturen hindeuten würde, bei allen Peptomeren ausbleibt.

Um den Effekt der fehlenden  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur der Peptomere auf die Affinität zu CXCL8 zu untersuchen, wurden Bindungsisothermen durch Messung der Fluoreszenzanisotropie aufgenommen (Abbildung 4.15).

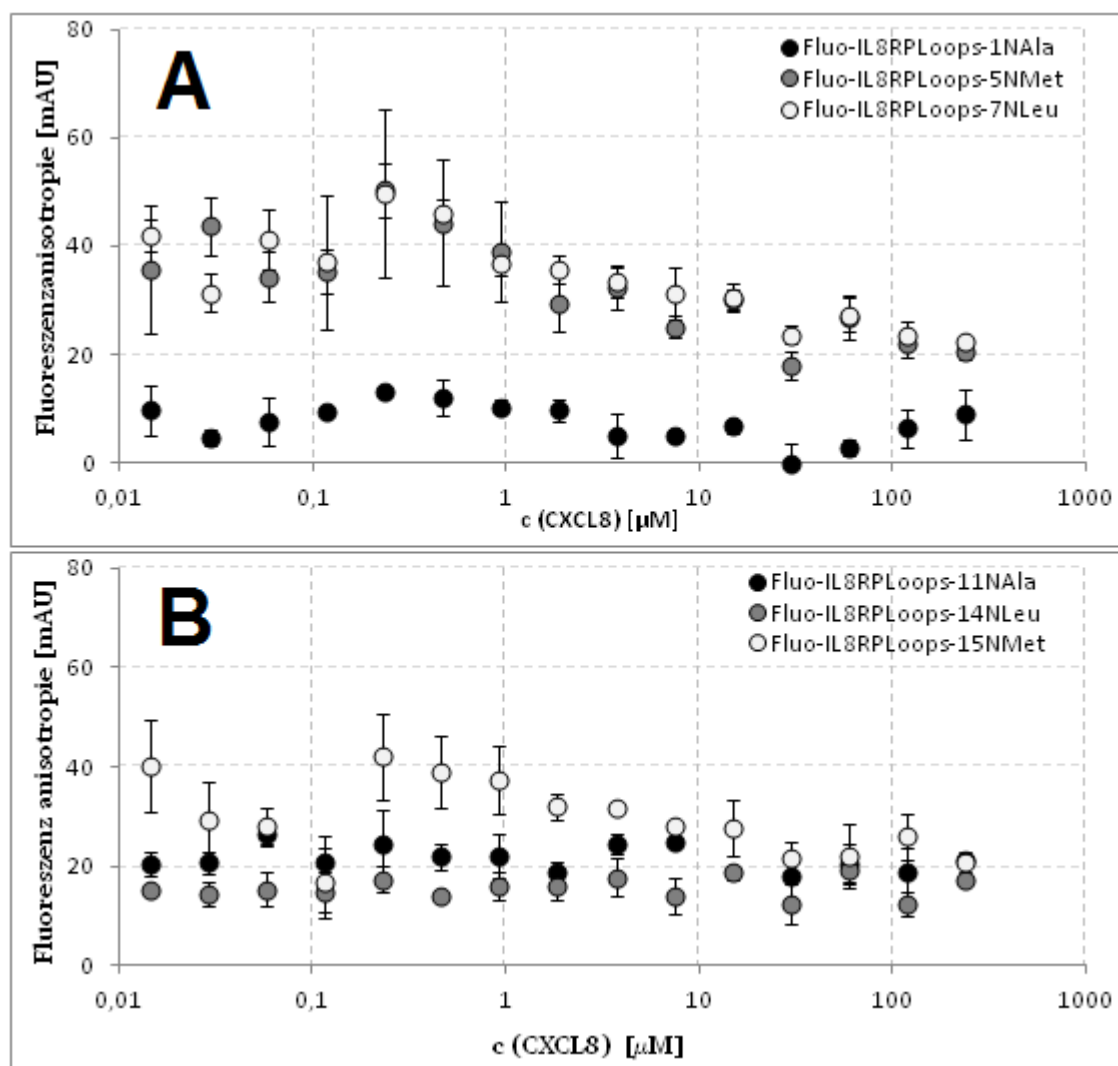


Abbildung 4.15: **A:** Fluoreszenzanisotropiemessung von Fluo-IL8RLoopsE-1NAIa **9**, Fluo-IL8RLoopsE-5NMet **10** und Fluo-IL8RLoopsE-7NLeu **11** mit CXCL8.

**B:** Fluoreszenzanisotropiemessung von Fluo-IL8RLoopsE-11NAIa **12**, Fluo-IL8RLoopsE-14NLeu **13** und Fluo-IL8RLoopsE-15NMet **14** mit CXCL8.

Es konnte keine Bindung festgestellt werden. Die Mutationen führen zum Verlust der Affinität zu CXCL8. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachmessung an.

Durch CD-Spektroskopie konnte bestätigt werden, dass durch die Mutationen der einzelnen Aminosäuren zu Peptoidbausteinen die  $\alpha$ -helikale Struktur, die bei Fluo-IL8RLoopsE **7** vorliegt, ausgeschaltet werden konnte. Dadurch kam es zum Verlust der Affinität zu CXCL8, die auch beim strukturell ungeordneten Fluo-IL8RLoopsQ **8** nicht vorhanden war. Auffällig bei den Ergebnissen der Fluoreszenzanisotropiemessungen ist, dass bei steigender Proteinkonzentration die Anisotropie einiger Varianten leicht abzunehmen scheint, sowie die verhältnismäßig niedrige Anisotropie einiger der peptomeren Mutanten (Abbildung 4.16).

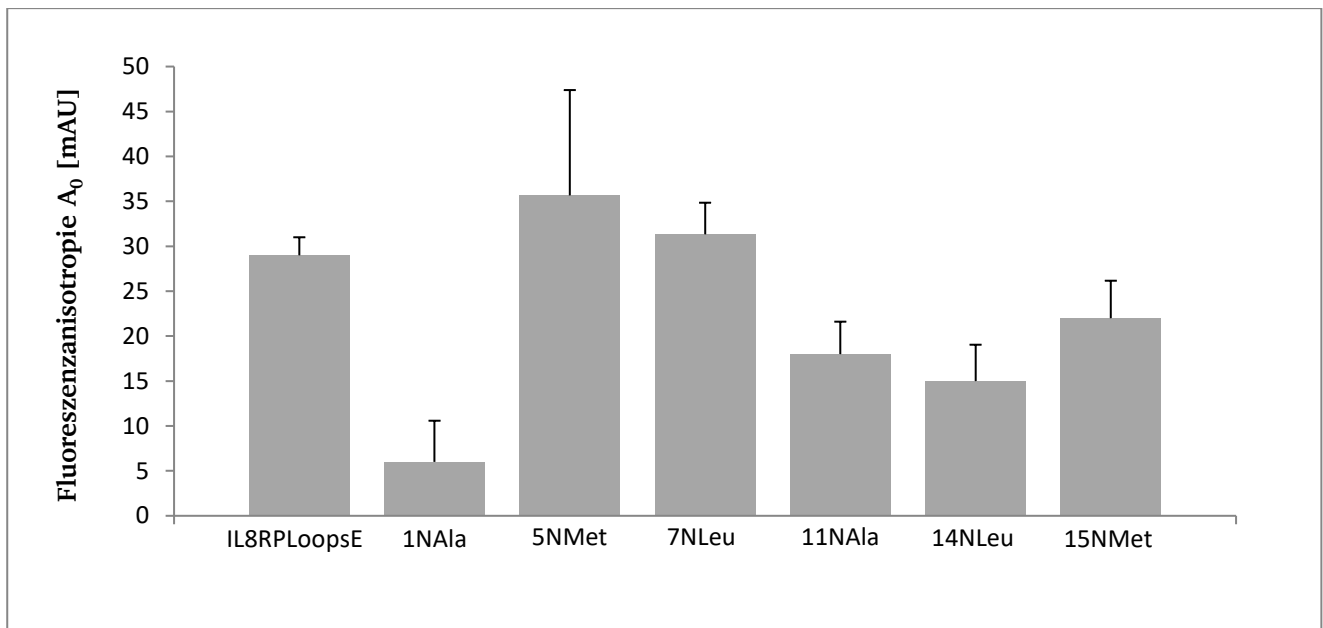


Abbildung 4.16: Fluoreszenzanisotropien  $A_0$  von 200 nM Lösungen des Peptids Fluo-IL8RPLoopsE **7** und der Peptomere **9-14** in Puffer C. Die Mutante Fluo-IL8RPLoopsE-1NALa **9** zeigt die niedrigste Anisotropie aufgrund der direkten Nachbarschaft zum Fluoreszenzmarker. Fluo-IL8RPLoopsE-5NMet **10** und Fluo-IL8RPLoopsE-7NLeu **11** zeigen eine ähnliche Anisotropie wie das Ausgangspeptid Fluo-IL8RPLoopsE **7**. Fluo-IL8RPLoopsE-11NALa **12**, Fluo-IL8RPLoopsE-14NLeu **13** und Fluo-IL8RPLoopsE-15NMet **14** liegen leicht unterhalb der Anisotropie des Ausgangspeptids. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachmessung an.

Die Tatsache, dass alle Mutationen zu einem Verlust der Sekundärstruktur und der Bindungsaffinität zu CXCL8 geführt haben, lässt darauf schließen dass die teilweise  $\alpha$ -helikale Struktur von IL8RPLoopsE **6** einen wesentlichen Einfluss auf die Affinität hat. Schon eine einzige Mutation einer helixbegünstigenden Aminosäure gegen ihr peptoidisches Pendant reicht aus, um die Affinität gegenüber CXCL8 komplett aufzuheben.

Um sicherzustellen, dass dieser Einfluss auf die Bindungsaffinität auf die Sekundärstruktur des Peptids zurückzuführen ist, und nicht generell auf den Austausch der Aminosäure mit einer N-substituierten Glycin, wurde das gleiche Experiment mit einem Peptid wiederholt, das eine Affinität zu CXCL8 zeigt, aber eine ungeordnete Struktur aufweist. Das Peptid „CXCR1-p1“ **15** mit der Sequenz MWDFDD-Ahx-MPPADEDYSP ist vom ungeordneten N-Terminus des Rezeptors CXCR1 abgeleitet und wurde zuerst in einer Arbeit von Attwood *et al.* untersucht.<sup>[224]</sup> Wird der Chou-Fasman-Algorithmus auf die Sequenz dieses Peptids angewandt, ergibt sich, dass sowohl im N-terminalen Teil des Peptids als auch im C-terminale Teil Nukleationssequenzen für  $\alpha$ -Helices vorhanden sind, diese aber im C-terminalen Teil vollständig mit Abbruchsequenzen überlagert werden (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Sequenz von CXCR1-p1 15 mit den dazugehörigen Chou-Fasman-Parametern für die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von  $\alpha$ -Helices ( $P_\alpha$ ) und  $\beta$ -Strängen ( $P_\beta$ ). In grün sind die Sequenzabschnitte für mögliche Nukleationsstellen angegeben und in orange Abbruchsequenzen für die dazugehörige Sekundärstruktur. In grau wurde eine mögliche Abbruchsequenz hervorgehoben. Diese ergibt sich dadurch, dass Ahx durch seine hohe Flexibilität vermutlich zu einem Abbruch beiträgt.

	M	W	D	F	D	D	Ahx	M	P	P	A	D	E	D	Y	S	P
$P_\alpha$	145	108	101	113	101	101	-	145	57	57	142	101	151	101	69	77	57
+							-										
-							-										
$P_\beta$	105	137	54	138	54	54	-	105	55	55	83	54	37	54	147	75	55
+							-										
-							-										

Obwohl der N-Terminus des Peptids CXCR1-p1 15 dazu neigen könnte, eine  $\alpha$ -Helix auszubilden, ist dies nicht literaturbekannt. Es ist davon auszugehen, dass die Sequenz FDDAhx, durch den relativ niedrigen mittleren  $P_\alpha$  und die hohe Flexibilität von Ahx, als Abbruchsequenz für die  $\alpha$ -Helix fungiert. Dadurch kann, trotz vorhandener Nukleationsstelle, keine Helix ausgebildet werden und es resultiert eine ungeordnete Struktur für CXCR1-p1 15. Dieses Peptid mit einem literaturbekannten  $K_i$  von  $7 \mu\text{M}$  wurde synthetisiert und am N-Terminus mit Fluorescein markiert (siehe Kapitel 6.5.2), um Fluo-CXCR1-p1 16 zu erhalten.<sup>11</sup> Durch Messung der Fluoreszenzanisotropie wurde eine Bindungsaffinität von  $K_d = 6.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$  zu CXCL8 bestimmt (Abbildung 4.17).

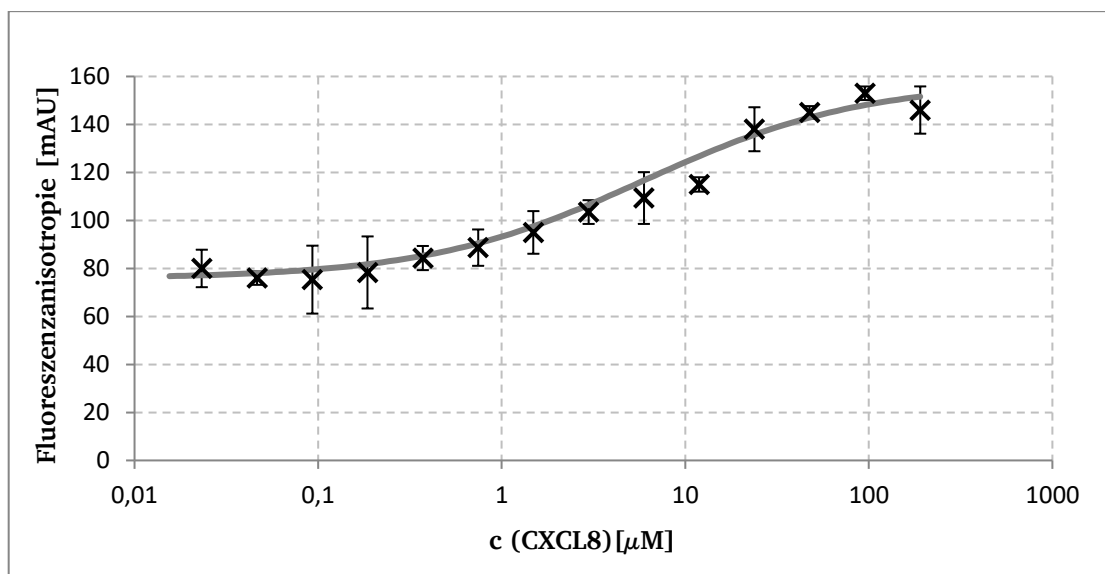


Abbildung 4.17: Fluoreszenzanisotropiemessung von Fluo-CXCR1-p1 16 mit CXCL8. Die  $K_D$  liegt bei  $6.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$ . Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachmessung an.

In Arbeiten von Hebert *et al.* und Skelton *et al.* wurden bereits einige Aminosäuren aus Sequenzen des CXCR1 Rezeptors, die auch in CXCR1-p1 15 inkorporiert sind, als Interaktionspartner mit CXCL8 identifiziert.<sup>[72, 77]</sup>

<sup>11</sup> Synthetisiert von K. Schmitz und P. Wadhwani (Syro II multiple peptide synthesizer, Institute of Biological Interfaces 2, KIT, Karlsruhe)

Um den Einfluss des Austauschs einer Aminosäure mit dem äquivalenten Peptoidbaustein auf die Bindungsaffinität zu untersuchen, wurden sieben Mutationen ausgewählt (Tabelle 4.3). 12D, 13E, 14D und 15Y interagieren laut Literatur mit CXCL8 und eine Mutation könnte daher einen großen Einfluss auf die Affinität haben. Ein Austausch von 1M, 8M und 11A hingegen sollte lediglich die Flexibilität des Peptomerrückgrats erhöhen und weniger ausschlaggebend für die Bindung an CXCL8 sein.

Tabelle 4.3: Sequenz von CXCR1-p1 **15** mit den dazugehörigen Chou-Fasman-Parametern für die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von  $\alpha$ -Helices ( $P_{\alpha}$ ). Aminosäuren, die laut Literatur mit CXCL8 interagieren, sind orange markiert. In grün wurden die stärksten Helixbildner ( $P_{\alpha} \leq 120$ ) hervorgehoben. Die mit x markierten Aminosäuren wurden für den Austausch durch einen analogen Peptoidbaustein ausgewählt.

	M	W	D	F	D	D	Ahx	M	P	P	A	D	E	D	Y	S	P
$P_{\alpha}$	145	108	101	113	101	101	-	145	57	57	142	101	151	101	69	77	57
	x						-	x			x	x	x	x	x		

Die ausgewählten Mutanten wurden synthetisiert und am N-Terminus mit Fluorescein markiert (siehe Kapitel 6.5.2).<sup>[227, 345]</sup> Dabei wurde an der jeweiligen Stelle des Aminosäureaustauschs das zur Seitenkette analoge primäre Amin durch die Submonomermethode eingefügt.<sup>[271]</sup> Die Bindungskonstanten zu CXCL8 wurden durch Messung der Fluoreszenzanisotropie bestimmt (Tabelle 4.4 und Abbildung 8.3 - Abbildung 8.9).

Tabelle 4.4: Bindungskonstanten der synthetisierten Mutanten von CXCR1-p1 **15**. Der angegebene Faktor gibt die Änderung der Bindungsaffinität gegenüber der des Ausgangs-peptids ( $K_d = 6.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ) an.

Mutante	Peptomer Nummer	$K_d \pm \text{STABW} [\mu\text{M}]$	Faktor
Fluo-Att1NMet <sup>+0</sup>	<b>17</b>	$56 \pm 15$	0.11
Fluo-Att8NMet <sup>+0</sup>	<b>18</b>	$22 \pm 6$	0.27
Fluo-Att11NAla <sup>+0</sup>	<b>19</b>	$18 \pm 2$	0.33
Fluo-Att12NAsp <sup>+0</sup>	<b>20</b>	$54 \pm 9$	0.11
Fluo-Att13NGlu <sup>+0</sup>	<b>21</b>	$23 \pm 10$	0.26
Fluo-Att14NAsp <sup>+0</sup>	<b>22</b>	$27 \pm 5$	0.23
Fluo-Att15NTyr <sup>+1</sup>	<b>23</b>	$28 \pm 5$	0.21

Durch den Austausch einzelner Aminosäuren in der Sequenz von CXCR1-p1 **15** mit Peptoidbausteinen wurde kein vollständiger Verlust der Bindungsaffinität zu CXCL8 erreicht. Die Mutanten zeigten alle eine verringerte Affinität zu CXCL8 mit einer Änderung von bis zu einer Größenordnung, wobei Fluo-Att1NMet<sup>+0</sup> **17** und Fluo-Att12NAsp<sup>+0</sup> **20** die größte Veränderung zeigen.

Der teilweise Verlust der Bindungsaffinität kann auf die erhöhte Flexibilität des Peptidrückgrats, das Verschieben der Seitenkette vom  $\alpha$ -C zum im Rückgrat eingebetteten Stickstoff und den resultierenden räumlichen Übergang der Seitenkette von einer Seite des Rückgrats auf die andere zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen verschiedener Forschungsgruppen, die Wechselwirkungen von Peptoiden und Peptid-Peptoid-Chimären an spezifischen Proteinoberflächen untersucht haben. So wurden beispielsweise die Scr homology 3 (SH3) Domäne und die Ena-VASP homology 1 Domäne aufgrund ihres Bindungsvermögens zu Prolin-reichen Sequenzen, als auch MHC class II im Hinblick auf ihr

---

Bindungsverhalten zu Peptoiden untersucht.<sup>[353-355]</sup> Generell führt die direkte Übersetzung bioaktiver Peptidsequenzen in Peptoide oder deren Chimären zu niedrigerer Bindungsaffinität der resultierenden Substanzen.<sup>[356]</sup> Durch Makrozyklisierung kann die Stabilität der bindenden Konformation erhöht werden was es erlaubt Sequenzen zu generieren, die erhöhte Bindungsaffinität zeigen und als Antagonisten für Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen.<sup>[357]</sup>

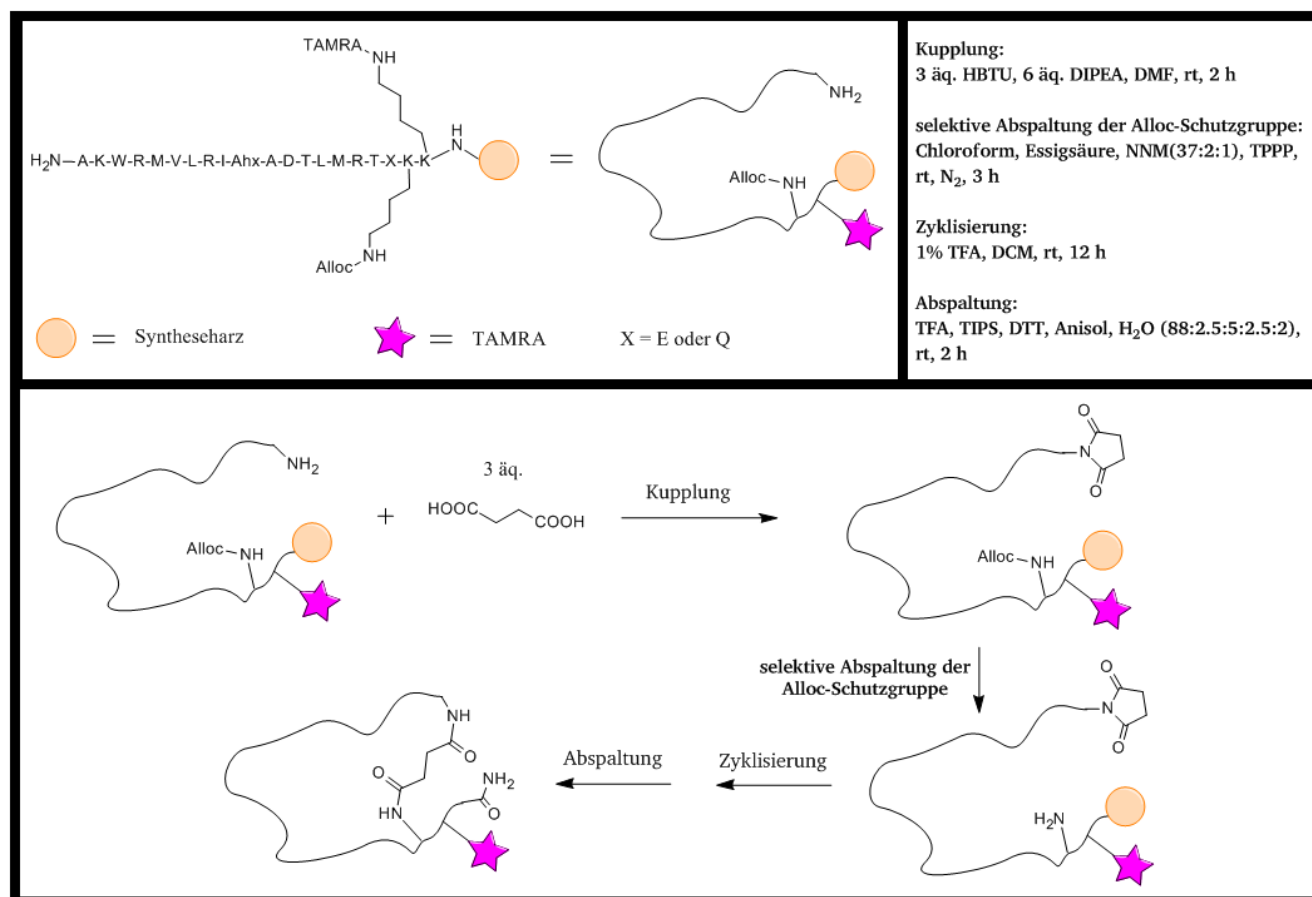
---

#### 4.2.2. Interaktionen zyklisierter IL8RPLoops-Varianten mit CXCL8

---

Diese Wechselwirkungen beider Peptidtermini sorgen für eine nicht-kovalente Zyklisierung des Peptids IL8RPLoopsE **6**. Es wird angenommen, dass durch diese Zyklisierung weniger Bewegungsfreiheitsgrade existieren und dies bei der Bindung an das Chemokin zu einem verringerten Entropieverlust führt.<sup>[357]</sup> Wenn dieser entropische Effekt die Bindung unterstützt, sollten kovalent zyklisierte Peptide grundsätzlich eine höhere Affinität zum Chemokin aufweisen. Es wurde daher jeweils eine zyklisierte Variante der beiden Peptide IL8RPLoopsQ **5** und IL8RPLoopsE **6** synthetisiert. Es musste gewährleistet werden, dass noch alle Seitenketten und der C-Terminus der zyklisierten Varianten für Interaktionen untereinander und mit Bindungspartnern zur Verfügung stehen. Gleichzeitig sollte der Linker aber so rigide sein, dass er die Peptid-Termini in unmittelbarer Nähe hält. Daher wurde die Zyklisierung durch Knüpfung einer Amidbindung zwischen einem am C-Terminus eingeführten Lysin-Reste und einem Bernsteinsäure-Linker am N-Terminus realisiert. Dadurch sollten alle möglichen Seitenketten und der C-Terminus für die Interaktion mit CXCL8 im Peptid zugänglich bleiben. Gleichzeitig könnte genug Beweglichkeit erhalten bleiben, um die Möglichkeit zur Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturelemente, die für die Bindung zu CXCL8 wichtig erscheinen, zu geben (vgl. Kapitel 4.2.1). Um die Fluoreszenzmarkierung für spätere Fluoreszenzanisotropiemessungen zu gewährleisten, wurde der äußerste C-Terminus der Peptide um jeweils ein Lysin mit orthogonaler Seitenkettenschutzgruppe (Mtt) erweitert. Diese wurde zu Beginn der Synthese selektiv entschützt und mit 5(6)Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) **24** markiert. Dieser Fluorophor wurde gewählt, da es im Gegensatz zu Fluorescein keine Hydroxy-Gruppen enthält die bei der weiteren Synthese Nebenreaktionen eingehen würden. Schema 4.1 zeigt das Syntheschema der Zyklisierung mit allen Reaktionsbedingungen (vgl. Kapitel 6.5.2).





Schema 4.1: Syntheschema der Zyklisierung von IL8RPCycLoopsQ **25** und IL8RPCycLoopsE **26**.

Chandra *et al.* beschrieben eine Methode für die Makrozyklisierung von Peptiden, die auf einer gleichzeitigen *in situ* Entschützung, Abspaltung und Zyklisierung von Peptiden durch Bildung einer Amidbindung zwischen einer freien Lysin-Seitenkette und einem am N-Terminus befindlichen Succinimid unter sauren Bedingungen abläuft.<sup>[358]</sup> In der hier verwendeten Variante wurde die Zyklisierung allerdings vor der Abspaltung des Peptids und der Entschützung der Seitenketten in einem separaten Schritt vorgenommen. Dabei wurde nach Generieren des N-terminalen Succinimids die Seitenkette eines in Position 2 befindlichen Lysin(Alloc)-Rests selektiv entschützt und anschließend unter mild sauren Bedingungen mit diesem gekuppelt, so dass es nicht zur Abspaltung vom Harz kommt. Der Erfolg der Reaktion wurde durch den Chloraniltest bestätigt. Bei dieser Methode bleiben alle anderen Seitenketten des Peptids geschützt und können so keine Nebenreaktionen eingehen. Sie werden erst bei der Abspaltung vom Harz freigesetzt. Die beiden zyklischen Peptide wurden analog zu ihren linearen Vorgängern IL8RPCycLoopsQ **25** und IL8RPCycLoopsE **26** genannt.

Eine MD-Simulation der beiden zyklischen Strukturen zeigte nach Berechnung der durchschnittlichen Sekundärstrukturelemente einen vollständigen Verlust der helikalen Anteile in beiden Sequenzen (Abbildung 4.18).<sup>12</sup> Um das Ergebnis der Simulationen experimentell zu unterstützen, wurden CD Spektren der Peptide aufgenommen.<sup>13</sup> Die Spektren zeigen wie zu erwarten ein Minimum bei 201 nm, das auf ungeordnete Strukturen hinweist. Eine Schulter bei etwa 222 nm, die auf  $\alpha$ -Helices hindeuten würde, blieb aber bei beiden Peptiden wie von der MD-Simulation vorhergesagt aus (Abbildung 4.19).

<sup>12</sup> Durchgeführt von Philipp Babel, AK Hamacher, TU Darmstadt.

<sup>13</sup> Betreut und durchgeführt von Philipp Czechowski, AK Reggelin, TU Darmstadt

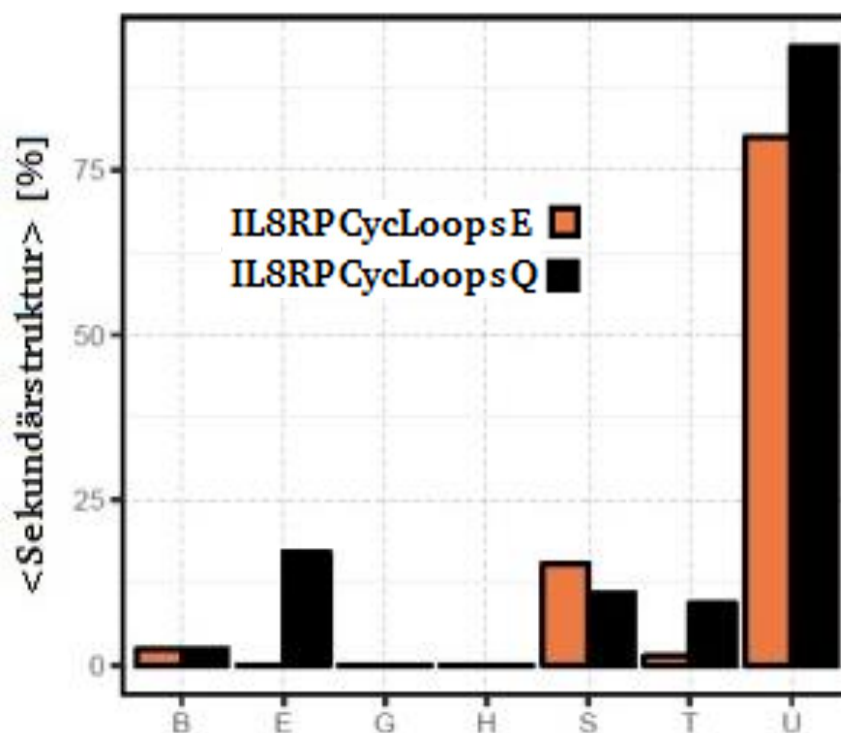


Abbildung 4.18: Aus MD-Simulationen über die Zeit gemittelttes Auftreten von Sekundärstrukturelementen von IL8RPCycLoopsQ **25** (schwarz) und IL8RPCycLoopsE **26** (orange). B = isolierte  $\beta$ -Brücke, E = ausgedehnter  $\beta$ -Strang, G =  $3_{10}$ -Helix, H =  $\alpha$ -Helix, S = Biegung Knick ohne Wasserstoffbrücke (Übersetzung prüfen!), T = beta-Schleife, U = ungeordnete Struktur.

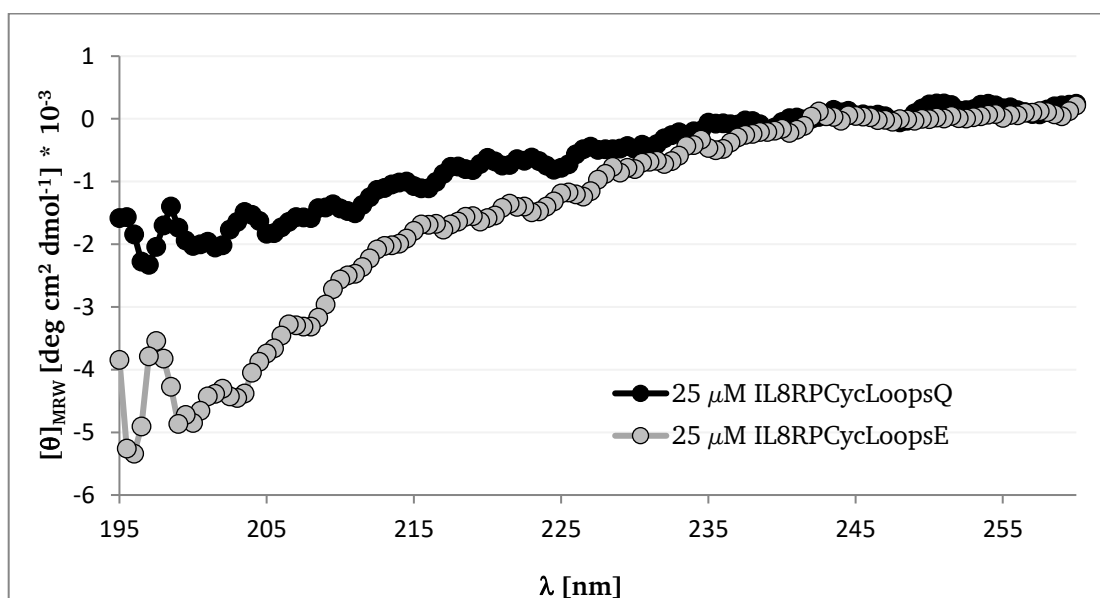


Abbildung 4.19: CD-Spektrum von IL8RPCycLoopsQ **25** und IL8RPCycLoopsE **26**. Das Minimum bei 201 nm zeigt eine ungeordnete Struktur in den Peptiden an. Eine Schulter bei 222 nm würde auf  $\alpha$ -helikale Strukturen hindeuten, die jedoch bei beiden Peptiden nicht nachweisbar sind.

Zusätzlich wurden die aus der MD-Simulation erhaltenen RMSD Werte beider zyklischen Peptide über die Simulationsdauer miteinander verglichen (Abbildung 4.20). Hier zeigt IL8RPCycLoopsQ **25** entgegen den

Erwartungen eine stabilere Struktur, während IL8RPLoopsE **26** eine leicht erhöhte Fluktuation der Konformation über die Zeit aufweist. Dies wird ebenfalls durch die höheren RMSF Werten von IL8RPLoopsE **26** verdeutlicht, die die Fluktuation über alle Atome des Moleküls gemittelt angeben. Im Vergleich mit ihren linearen Vorgängern zeigen IL8RPCycLoopsQ **25** und IL8RPCycLoopsE **26** dabei eine geringere Flexibilität als das unstrukturierte IL8RPLoopsQ **5** aber eine höhere Flexibilität als IL8RPLoopsE **6** (vgl. Abbildung 4.12).

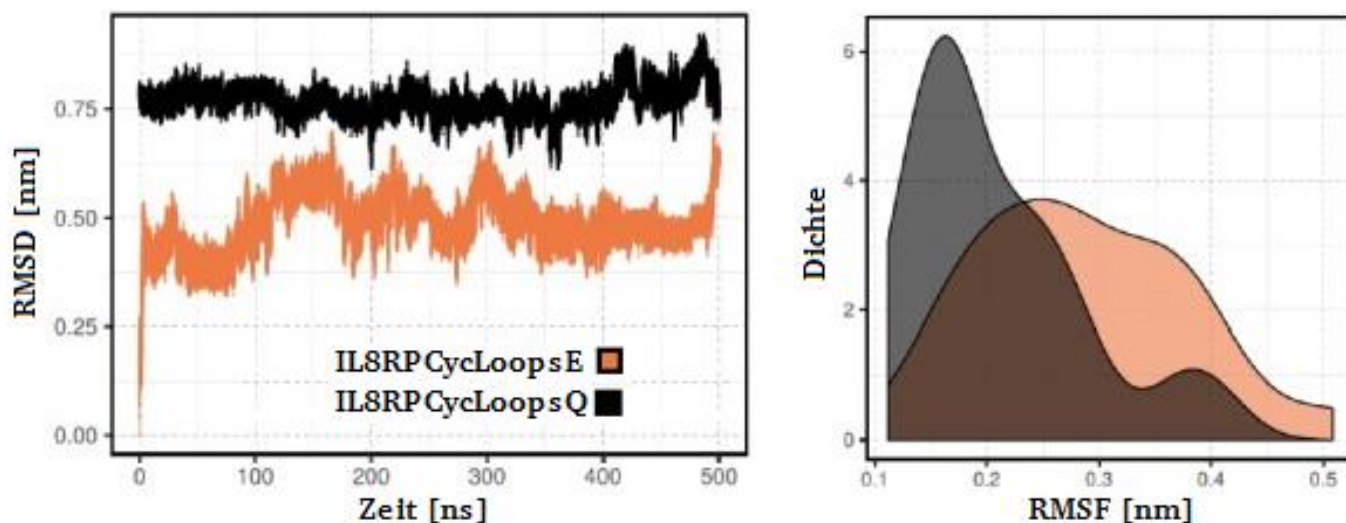


Abbildung 4.20: Vergleich der RMSF und RMSD Werte der MD-Simulationen von IL8RPCycLoopsQ **25** (schwarz) und IL8RPCycLoopsE **26** (orange). Die RMSD Werte von IL8RPCycLoopsE **26** und IL8RPCycLoopsQ **25** über die Simulationszeit (links) und die RMSF Werte als Dichteverteilung (rechts) zeigen, dass die Flexibilität des Peptidrückgrats von IL8RPCycLoopsE **26** etwas höher ist als die von IL8RPCycLoopsQ **25**.

Um die Auswirkung der stabilisierten zyklischen Struktur der Peptide auf die Affinität zu CXCL8 zu untersuchen, wurden Bindungsisothermen durch Messung der Fluoreszenzanisotropie aufgenommen (Abbildung 4.21). Dabei ergab sich für IL8RPCycLoopsE **26** eine  $K_d = 0.73 \pm 0.06 \mu\text{M}$  und für IL8RPCycLoopsQ **25** eine  $K_d = 0.78 \pm 0.13 \mu\text{M}$ . Diese Ergebnisse liegen leicht unter der Ausgangsaffinität des linearen Fluo-IL8RPLoopsE **7** mit einem  $K_d = 1.12 \pm 0.14 \mu\text{M}$  (vgl. Abbildung 4.13). Dieses Verhalten ist dadurch erklärbar, dass die rigidere Struktur des Makrozyklus durch einen reduzierten entropischen Nachteil beim Binden an das Zielprotein eine niedrigere freie Bindungsenergie aufweist.<sup>[357, 359-360]</sup> Die ähnlichen Bindungsaffinitäten der zyklisierten Peptide können darauf zurückgeführt werden, dass eine strukturelle Stabilisierung und somit Erhöhung der Bindungsaffinität hier durch die Makrozyklisierung gegeben ist und keine der Varianten mehr helikale Teile aufweist. Damit sehen sich die Peptide räumlich sehr ähnlich und unterscheiden sich in auch keinem Rest, der bisher für die Rezeptor-Ligand Wechselwirkung als essentiell nachgewiesen wurde.

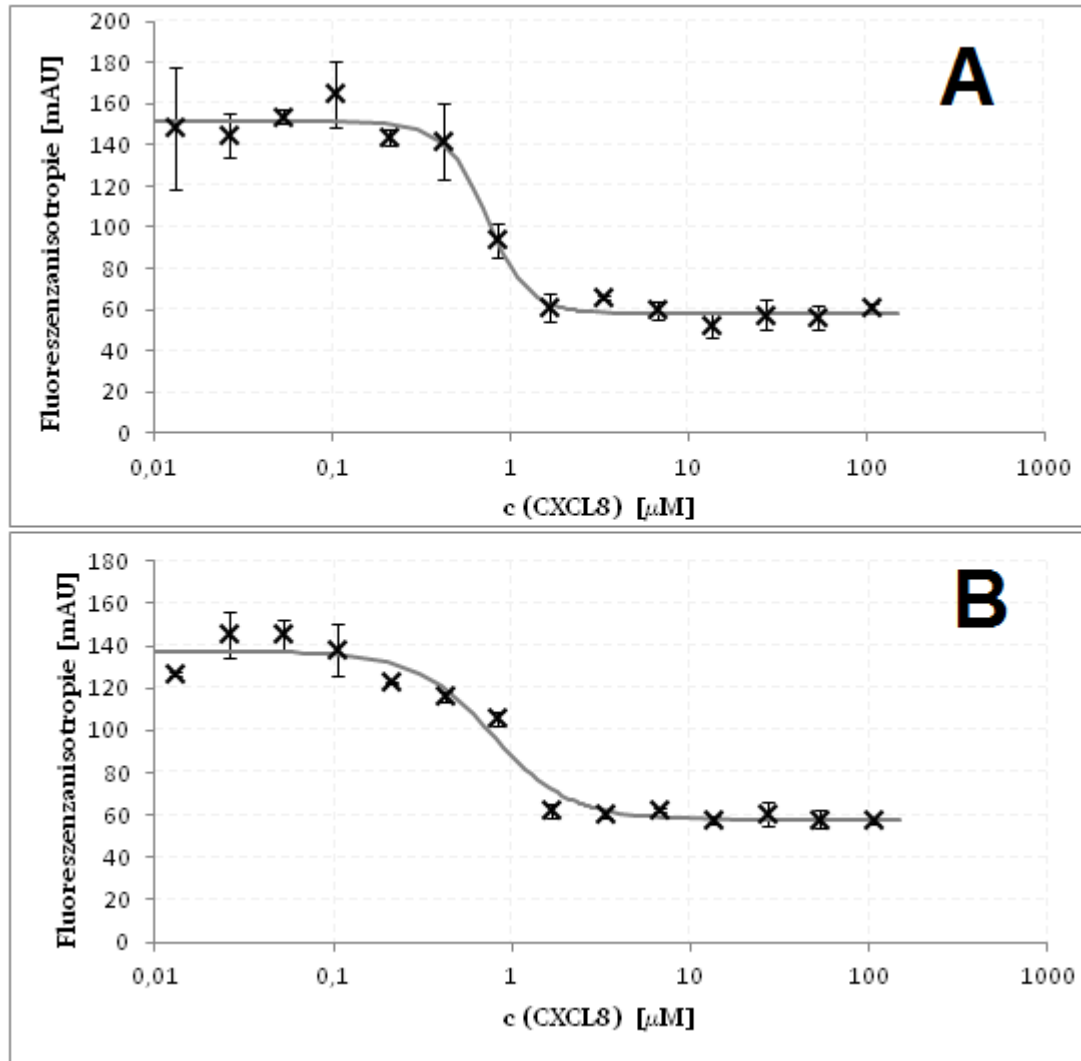


Abbildung 4.21: Fluoreszenzanisotropiemessung von (A) IL8RPCycLoopsE **26** mit CXCL8. Der Wendepunkt der Kurve liegt bei  $0.73 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ; B: IL8RPCycLoopsQ **25** mit CXCL8. Der Wendepunkt der Kurve liegt bei  $0.78 \pm 0.13 \mu\text{M}$ .

Die Bindungsisothermen sind im Vergleich zur erwarteten Kurven invertiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Dreifachmessung an.

Auffällig ist, dass die Bindungsisothermen der beiden Peptide invers verlaufen. Da die Fluoreszenzanisotropie ein Maß für die Beweglichkeit des Fluorophors ist, sprechen diese Ergebnisse für eine erhöhte Beweglichkeit des Fluorophors im Komplex des Peptids mit CXCL8 und für eine reduzierte Beweglichkeit des Fluorophors im freien Peptid. Die sehr hohe Fluoreszenzanisotropie der beiden zyklischen Peptide bei niedrigen Proteinkonzentrationen spricht ebenfalls dafür, dass die Fluorophore beider Peptide eine ungewöhnlich hohe Rotationskorrelationshalbwertszeit aufweisen. Es wird angenommen, dass diese auf Wechselwirkungen des Peptids mit dem kovalent gebundenen Fluorophor zurückzuführen ist. MD-Simulationen der beiden Sequenzen zeigten, dass die im Zyklus befindlichen Fluorophore intramolekular mit der Peptidsequenz interagieren und damit im ungebundenen Zustand des jeweiligen Peptids in den Ring falten (Abbildung 4.22).

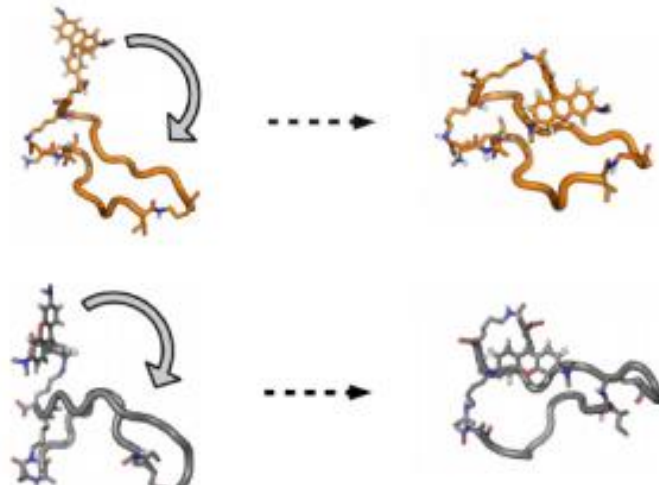


Abbildung 4.22: Graphische Darstellung der MD-Simulationen von IL8RPCycLoopsQ **25** (grau) und IL8RPCycLoopsE **26** (orange) nach 270 ns und 350 ns Simulationszeit: Der Fluorophor (TAMRA **24**) faltet in die Mitte des durch das Peptid gebildeten Rings.

Beim linearen IL8RPLoopsE Peptid **6** gab es keine Hinweise auf diesen Effekt, was darauf schließen lässt, dass die nicht kovalente Zyklisierung nicht stabil genug ist um die Wechselwirkung mit dem Fluorophor zu begünstigen. Eine andere Konformation des linearen Peptids kann auch die Wechselwirkung mit dem Fluorophor einschränken.

Die Berechnung der Distanzen ( $d$ ) zwischen den Massenzentren (*center of mass*; com) der Peptide und denen der Fluorophore als Funktion der Zeit zeigt ebenfalls die Tendenz des Fluorophors sich im Inneren des Makrozyklus aufzuhalten (Abbildung 4.23).

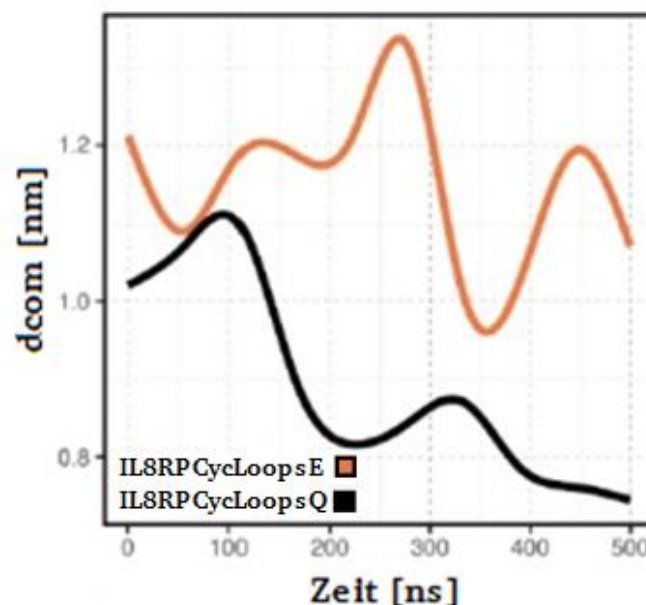


Abbildung 4.23: Distanzen zwischen den Massenzentren der Peptide IL8RPCycLoopsQ **25** (schwarz) bzw. IL8RPCycLoopsE **26** (orange) und dem in der Sequenz inkorporierten Fluorophor TAMRA als Funktion der Simulationsdauer.

Zur Identifizierung der Kontaktstellen zwischen TAMRA **24** und der Peptidsequenz wurden aus den Simulationsdaten die radiale Dichtefunktion (rdf) zwischen TAMRA und allen Aminosäuren der Sequenz berechnet (Abbildung 4.24). Dadurch konnten die vormaligen C-terminalen Reste E18, Q18, T17 und R16 als

die stärksten Interaktionspartner für TAMRA identifiziert werden, während die nun benachbarten N-terminalen Reste eine geringere Interaktion aufzeigen. Der Fluorophor scheint bei IL8RPCycLoopsQ **25** räumlich stärker an das Peptid gebunden zu sein als bei IL8RPCycLoopsE **26**. Das erklärt auch den Unterschied in der RMSD, die bei IL8RPCycLoopsQ **25** etwas höher liegt (vgl. Abbildung 4.20).

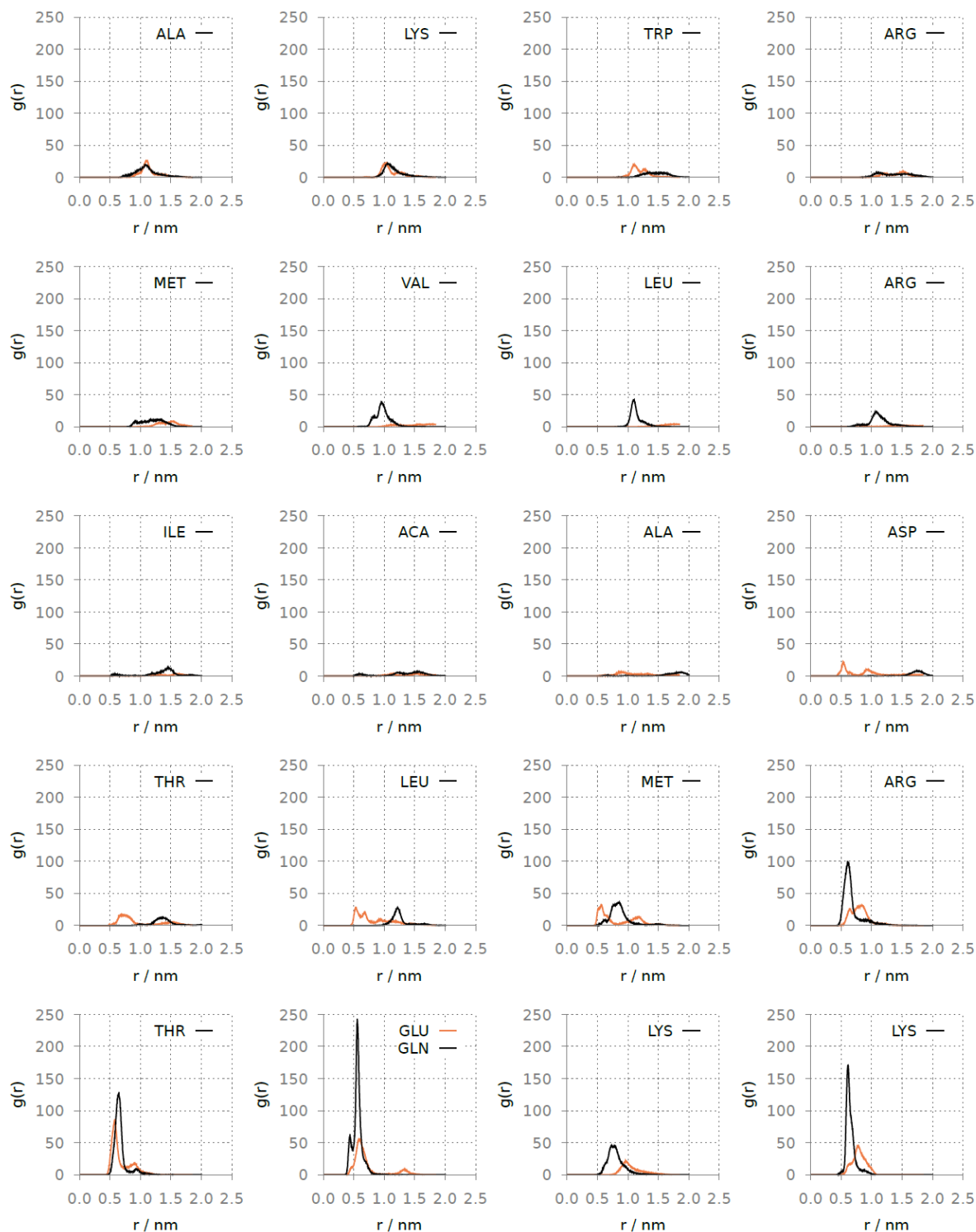


Abbildung 4.24: Radiale Dichtefunktion zwischen den Massenzentren von TAMRA und allen Aminosäuren von IL8RPCycLoopsQ **25** (schwarz) bzw. IL8RPCycLoopsE **26** (orange). Die stärksten Interaktionen mit  $g(r) \leq 50$  zeigen R16, T17, E18/Q18, K19 und K20. Die Aminosäure-Sequenz startet links oben mit 1A und endet rechts unten mit 20K.



---

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Interaktion des jeweiligen Peptids mit CXCL8 in der Verdrängung des Fluorophors und damit in dessen erhöhter Beweglichkeit resultiert und so inverse Anisotropieisothermen ermittelt werden. Als Voraussetzung für diesen Effekt muss eine größere Affinität des Peptids an CXCL8 als die des Fluorophors mit dem Peptidmakrozyklus angenommen werden. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität während Verdrängung eines Fluorophors von einem Protein wurde bereits in Biosensor-Systemen genutzt. Ueda *et al.* haben TAMRA-markierte Biosensoren, „Quenchbodies“ oder „Q-Bodies“ genannt, beschrieben, die den Farbstoff in der single-chain variablen Region von Antikörperfragmenten (scFv) inkorporieren<sup>[361-362]</sup> Durch Antigen-Bindung an Q-Bodies steigt die Fluoreszenzintensität von TAMRA, während das Fluorophor verdrängt wird, seine Mobilität erhöht und damit die Fluoreszenzanisotropie sinkt.<sup>[363]</sup>

Zahlreiche Bemühungen zyklische Peptide und Peptidmimetika zu generieren, die in Protein-Protein-Wechselwirkungen eingreifen, unterstreichen ihre Stärken gegenüber ihren linearen Vorgängern. Zyklische Liganden haben sich in Zellmodellen und *in vivo* generell durch verbesserte Eigenschaften in Bioverfügbarkeit, Absorption, Metabolismus, Exkretion und Toxizität (ADMET), sowie Pharmakodynamik und Pharmakokinetik ausgezeichnet.<sup>[357]</sup> Bemühungen die Bioverfügbarkeit, *in vivo* Halbwertszeit und Membranpermeabilität peptidischer Liganden zu verbessern wurden beispielsweise auch durch Ersetzen der Seitenkette vom  $\alpha$ -C mit einem homologen  $\beta$ -ständigen Rest oder einer reversiblen Kupplung mit kleinen Serumproteinen wie Albumin oder Transthyretin erreicht.<sup>[364-365]</sup> Der globale Wechsel der Pharmaindustrie von kleinen Molekülen hin zu Peptiden und Proteinen bekräftigen die Entwicklung neuer chemischer Strategien zur Generierung zyklischer Peptide, die in diesen Eigenschaften ihren linearen Vorgängermolekülen überlegen sind.<sup>[366-368]</sup>

---

#### 4.2.3. Proteasestabilität von IL8RP-CycLoops

---

Die Zyklisierung von Peptiden stabilisiert durch die konformationale Einschränkung deren Struktur. Das rigide Peptidrückgrat und das Fehlen der freien Termini führen darüber hinaus zu einer erhöhten Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau. Der Effekt von nicht-kovalenter und kovalenter Zyklisierung verschiedener bioaktiver Peptide auf deren Serumstabilität und Resistenz gegen bestimmte Proteasen wurde bereits eingehend studiert, wobei je nach Zyklisierungsmethode und eingesetzter Proteasen eine signifikante Stabilitätserhöhung der jeweiligen Peptide nachgewiesen werden konnte.<sup>[369-380]</sup> In dieser Arbeit wurde überprüft, ob es zu einer Erhöhung der Resistenz des zyklisierten Peptids IL8-RPCycloopsQ 25 gegenüber der Protease Trypsin kommt. Trypsin wurde gewählt, da es selektiv hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, die insgesamt viermal in der Sequenz der zu untersuchenden Peptide vorkommen. Da Trypsin eine Endopeptidase ist, kann außerdem ausgeschlossen werden, dass sich das Fehlen der freien Termini des zyklischen Peptids auf die Proteolyse auswirkt, womit lediglich die eingeschränkte Konformation die Zugänglichkeit der Protease an die Schnittstellen beeinflusst.

Zunächst wurde der Einfluss des Puffers auf die Proteaseaktivität kontrolliert, indem das bekannte Trypsin-Substrat N-Benzoyl-D,L-Arginin-p-nitroanilid (BAPNA) in Puffer C über Nacht bei RT umgesetzt und durch RP-HPLC untersucht wurde. Das Substrat und seine Spaltprodukte wurden bei einer Wellenlänge von 314 nm detektiert. Als Referenz wurde eine Probe auf gleiche Weise angesetzt und sofort analysiert.



Das im BAPNA enthaltene p-Nitrophenylanilid besitzt ein anderes Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\text{max}} = 315 \text{ nm}$ ) als das nach proteolytischer Spaltung freigesetzte p-Nitrophenylanilin ( $\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$ ). Dadurch kann die Trypsinaktivität entweder anhand der Abnahme des Eduktpeaks oder der Zunahme des Produktpeaks untersucht werden. Hier wurde aufgrund der größeren Signalintensität die Abnahme des Eduktes aufgenommen. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen wurde eine Abnahme von 57 % des Analyten beobachtet. Um einen Unterschied in der Proteaseresistenz durch Zyklisierung von IL8-RPCycloopsQ **25** nachzuweisen, wurde eine lineare Sequenz des Peptids mit Fluorescein markiert und wie beschrieben mit Protease umgesetzt. Durch Messung der Fluo-IL8-RPloopsQ Referenz **5**, wurde zunächst die Retentionszeit des Peptids sowie die Peakfläche bei einer Detektionswellenlänge von 440 nm (Absorptionsmaximum von Fluorescein in saurer Lösung) bestimmt. Nach Hydrolyse des Analyten mit Trypsin gibt die Abnahme des Fluorescein-Signals bei der relativen Retentionszeit des markierten Peptids Abschätzung über dessen proteolytischen Abbau.

Es wurde eine Abnahme der Peakfläche von 30% beobachtet, womit eine Hydrolyse des Peptids Fluo-IL8RP-LoopsQ **5** nachgewiesen werden konnte. Um den Einfluss der Zyklisierung von IL8-RPCycLoopsQ **25** auf die Proteasestabilität zu untersuchen, wurde die Messung auch mit dem zyklischen Peptid durchgeführt. Da bereits eine Markierung mit TAMRA in der Sequenz von IL8-RPCycLoopsQ **25** integriert ist, wurde die Detektionswellenlänge von 550 nm gewählt. Es konnte keine Hydrolyse des zyklischen Peptids IL8-RPCycLoopsQ **25** detektiert werden. Mit diesem semi-quantitativen Nachweis konnte gezeigt werden, dass die Zyklisierung eine Erhöhung der Proteaseresistenz zur Folge hat (Abbildung 4.25).

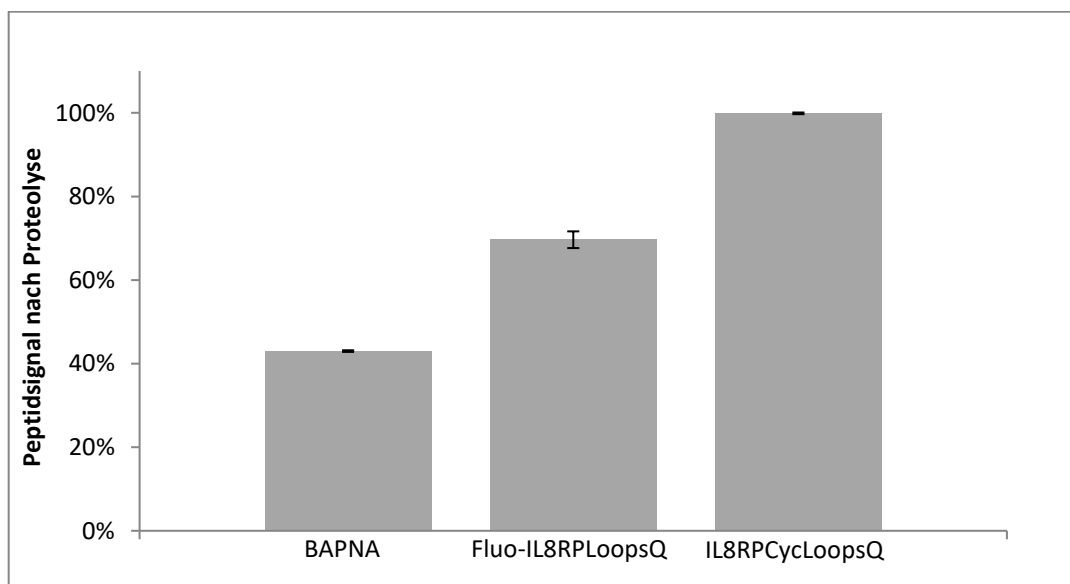


Abbildung 4.25: Resistenz verschiedener Substrate gegen Proteolyse durch Trypsin. Die Peakfläche des Analyten vor Proteolyse wurde ins Verhältnis mit der Peakfläche nach 12 h Inkubation mit Trypsin gesetzt. BAPNA und Fluo-IL8RPloopsQ **8** zeigen eine deutliche Degradation durch das Enzym, wohingegen IL8RPCycLoops noch zu annähernd 100 % vorliegt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Peakflächen dreier unabhängiger Messungen an.

---

### 4.3. Screening von *One-Bead-One-Compound* Bibliotheken<sup>14</sup>

---

In der biomedizinischen Forschung werden vor allem in akademischen Gruppen *One-Bead-One-Compound* Bibliotheken als ein wichtiges Werkzeug genutzt.<sup>[304, 381-384]</sup> Der Vorteil eine große Anzahl oberflächengebundener Substanzen hoher Diversität mit geringem experimentellem Aufwand gegen ein bestimmtes Zielmolekül screenen zu können, bringt allerdings auch hohe Anforderungen an die verwendete feste Phase, den Screeningprozess und die anschließende Analyse der Hits mit sich. Das konventionelle Screening von Substanzbibliotheken setzt eine detektierbare Markierung des Zielmoleküls voraus, das in Folge an die in der Bibliothek enthaltenen Liganden („Hits“) bindet und so die entsprechenden Partikel anfärbt. Diese Partikel werden danach unter dem Mikroskop visuell ermittelt und manuell isoliert, was für sehr große Bibliotheken ein sehr großen Arbeits- und Zeitaufwand bedeutet. Es wurden in der Vergangenheit zwar fluoreszenzaktivierte Beadsorter eingesetzt, um eine automatische Isolierung der fluoreszierenden Hits zu bewerkstelligen, diese Methode ist allerdings für die meisten kleineren Laboratorien nicht wirtschaftlich.<sup>[250-251]</sup> Des Weiteren kann die Eigenfluoreszenz der für die Bibliothek verwendeten Harzpartikel oder der Liganden selbst das Screening erschweren und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Durch eine zu hohe Beladungsdichte der Partikel können ebenfalls falsch Positive entstehen, da es zu Aviditätseffekten, also einer Affinitätsverstärkung durch Interaktionen zwischen mehreren Liganden und dem Zielmolekül selbst, kommen kann.<sup>[385]</sup> Das verwendete Harz sollte in Form, Größe und Oberflächenbeladung einheitlich und physikalisch robust sein, sodass keine Fragmentierung der Partikel auftritt. Außerdem sollte das Harz für die Synthese der Liganden mit organischen Lösemitteln, unter sauren und basischen Bedingungen und für das Screening mit wässrigen Puffern kompatibel sein. Es sollte des Weiteren sowohl hydrophobe als auch hydrophile Liganden in wässriger Umgebung auf der Oberfläche für das Screening präsentieren und keine unspezifischen Interaktionen mit dem Zielmolekül eingehen.<sup>[386]</sup> Da die Partikel manuell gescreent und einzeln analysiert werden, sollten sie außerdem groß genug sein, um sie mit bloßem Auge erkennen zu können und genügend Substanz tragen, um eine Analyse möglich zu machen. Die inhärente Fluoreszenz der Partikel sollte im Wellenlängenbereich der für das Screening verwendeten Fluorophore möglichst klein sein und der Linker auf den Partikeln muss chemisch orthogonal zu allen verwendeten Schutzgruppen der synthetisierten Liganden sein. In dieser Arbeit wurden zunächst in Kooperation mit Dorothea Helmer geeignete Synthesharze für die Erstellung und das Screening einer OBOC-Bibliothek untersucht.<sup>[1, 3]</sup> Es wurde der chemisch orthogonale 4-Hydroxymethyl-Benzoesäure (HMBA) Linker ausgewählt, der bei der sauren Seitenkettenentschüttung und bei der Acylierung mit Brom- und Chloressigsäure stabil ist (die Spaltung des HMBA-Linkers findet unter NH<sub>3</sub>-Atmosphäre statt) und somit für die Synthese von Peptoiden und deren Entschüttung auf dem Harz geeignet ist. Mehrere verschiedene Synthesharze wurden auf unspezifische Wechselwirkung mit *E. coli*-Lysat untersucht, wobei TentaGel-HMBA Macrobeads am wenigsten Wechselwirkungen zu denen im Lysat enthaltenen Proteinen zeigte.<sup>15</sup> TentaGel besteht aus einem Polystyrol-Harz, auf das Polyethylenglycol-(PEG)-Ketten gepfropft wurden, die sich durch eine hohe Wasserlöslichkeit und Proteinabstoßung auszeichnen, wodurch eine gute Quellung in wässrigem Puffer und eine geringe Neigung zu unspezifischen Bindungen resultieren.<sup>[387-388]</sup>

Da für TentaGel Harze berichtet wurde, dass sie in fluoreszenzbasierten Screenings durch Eigenfluoreszenz zu einem erhöhten Signal-zu-Rauschen-Verhältnis führen und damit die Untersuchungen fehleranfällig

---

<sup>14</sup> Teile der in diesem Kapitel vorgestellten Arbeit wurden bereits in Kooperation mit Dr. Dorothea Helmer veröffentlicht.<sup>[1, 3]</sup>

<sup>15</sup> Durchgeführt von Dr. Dorothea Helmer, damals TU Darmstadt (Darmstadt). heute Karlsruhe Institute of Technology (Karlsruhe)

werden, wurden zunächst die TentaGel-HMBA Macrobeads bei verschiedenen Belichtungszeiten unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.<sup>[257, 389-390]</sup> In Abbildung 4.26 ist klar zu erkennen, dass bei den in dieser Arbeit verwendeten Belichtungszeiten (1-100 ms) und Wellenlängen (RHO-Kanal – Exzitation 538-562 nm/ Emission 570-640 nm und FITC-Kanal – Exzitation 450-490 nm/ Emission 500-550 nm) durch die Eigenfluoreszenz der Partikel keine signifikante Störung bei dieser Methode zu erwarten ist.

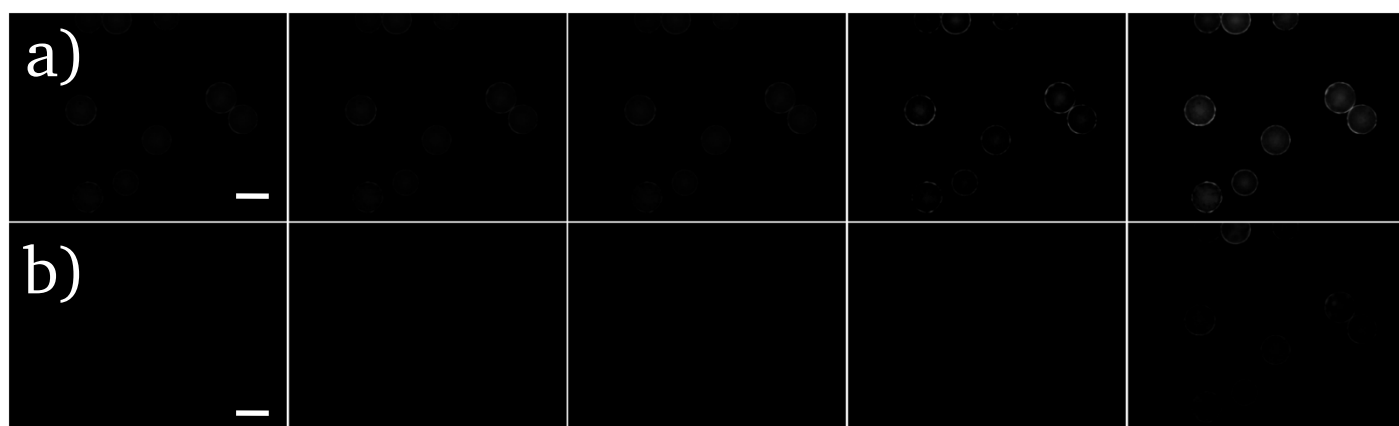


Abbildung 4.26: Fluoreszenz von TentaGel-HMBA MB in Puffer C im FITC-Kanal (a) und RHO-Kanal (b) des Fluoreszenzmikroskops. Die Belichtungszeit ist von links nach rechts ansteigend abgebildet (1 ms, 5 ms, 20 ms, 60 ms, 100 ms). Es ist zu sehen, dass bei höheren Belichtungszeiten eine geringe Eigenfluoreszenz des Harzes im FITC-Kanal zu erkennen ist. Skala: 300 µm.

Nach dem Quellen der Partikel im verwendeten Puffer, stieg deren Eigenfluoreszenz, was bereits näher in einer Arbeit von Dorothea Helmer untersucht und für vernachlässigbar befunden wurde.<sup>[3]</sup> Im Gegensatz dazu erhöht sich die Autofluoreszenz der Partikel im FITC-Kanal drastisch bei der Synthese von Peptiden und Peptoiden. Diese „erworbene Fluoreszenz“ wurde bereits 2013 von Hintersteiner *et al.* beschrieben.<sup>[391]</sup> Die erhöhte Fluoreszenz ist auf aromatische Seitenketten der Substanzen auf der Partikeloberfläche zurückzuführen und ist bei Peptiden, die Tryptophan enthalten, und Peptoiden, die Tryptamin enthalten, im FITC-Kanal am stärksten zu beobachten. Dieser Effekt kann das Screening gegen ein fluoreszenzmarkiertes Zielmolekül potentiell erschweren. In Abbildung 4.27 sind unbeladene TentaGel-HMBA MB Partikel im direkten Vergleich zu Partikeln, die mit einem Vergleichspeptid<sup>16</sup> DLYKVPSHCHPMMP **30** (1 Tyrosin und 2 Histidine in der Sequenz enthalten) funktionalisiert sind, im FITC und RHO-Kanal zu sehen. Man kann gut erkennen, dass das Peptid auf der Partikeloberfläche die Autofluoreszenz stark erhöht.

Das manuelle Separieren von Hits aus einem fluoreszenzbasiertes Screening ist für relativ kleine Bibliotheken noch ohne großen Zeit- und Geräteaufwand möglich. Diese Aufgabe wird für größere Bibliotheken mit hunderttausenden Substanzen allerdings wesentlich aufwändiger oder ist nur noch mit automatischen Beadsortern zu bewerkstelligen. Eine andere Möglichkeit, Bibliotheken zu screenen und sogar gleichzeitig Hits zu isolieren, bieten magnetische Separationsmethoden. Dabei wird das Zielmolekül entweder durch eine entsprechende Affinitätsmarkierung oder direkt an magnetische Partikel angebracht. Hierfür eignen sich zum Beispiel superparamagnetische Eisenoxid-Partikel in einer funktionalisierten Polymermatrix, die direkt mit dem Zielmolekül konjugiert werden können oder mit Streptavidin beschichtet werden, um ein

<sup>16</sup> Synthetisiert für Folgeversuche (vgl. Kapitel 4.3.1)

bioninyliertes Zielmolekül zu binden. Die magnetisierten Hits der Bibliothek lassen sich nun einfach mit einem Handmagneten von den restlichen Partikeln trennen, die nicht an das Zielmolekül binden.<sup>[251]</sup>

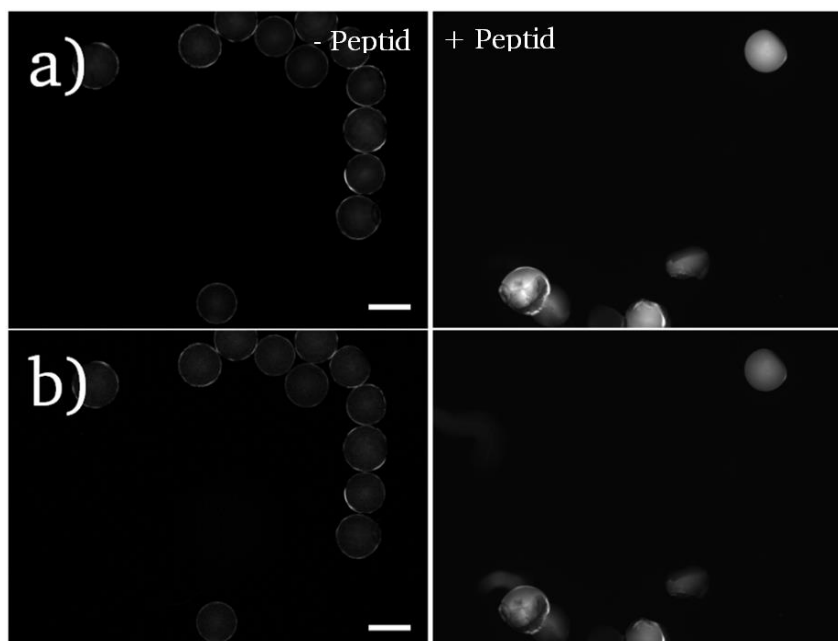


Abbildung 4.27: Gegenüberstellung von unbeladenen TentaGel-HMBA Macrobeads (links) und Partikeln mit oberflächengebundenem DLYKVPSHCHPMMP **30** (rechts) im FITC-Kanal (a) und RHO-Kanal (b) bei Belichtungszeiten von jeweils 40 ms. Der Vergleich zeigt, dass die Autofluoreszenz der Partikel bei der Synthese im Vergleich zu unfunktionalisierten Partikeln zunimmt. Skala: 300  $\mu\text{m}$ .

Diese Methode umgeht die Problematik der Autofluoreszenz der Partikel und den Aufwand, der mit dem Screening großer Bibliotheken verbunden ist. Allerdings werden beim magnetpartikelbasierten Screening weitere Anforderungen an das Syntheseharz gestellt. Die Beladung des Harzes mit möglichen Liganden muss ausreichend groß sein, dass sich genügend magnetisierbare Partikel auf dessen Oberfläche anlagern können, um den Harzpartikel in einem Magnetfeld zu mobilisieren. Allerdings darf die Beladung auch nicht zu hoch oder ungleichmäßig verteilt sein, um Aviditätseffekte ausschließen zu können, die zu falsch positiven Ergebnissen führen.<sup>[392]</sup> Die verwendeten Partikel müssen außerdem eine einheitliche Größe aufweisen, nicht agglomerieren und gleichmäßig mit Zielprotein bzw. Streptavidin beschichtet sein.

### 4.3.1. Visuelles Screening durch 2-Kanal-Fluoreszenzmikroskopie

Um die Probleme zu umgehen, die bei fluoreszenzbasierten Screeningmethoden durch Autofluoreszenz und erworbene Fluoreszenz der Partikel auftreten können, wurde in dieser Arbeit in Kooperation mit Dorothea Helmer eine neue Methode entwickelt bei der, unter Verwendung eines gelben Fluorophors als Markierung, Fluoreszenzbilder aus FITC- und RHO-Kanal in Falschfarben grün und rot dargestellt und überlagert werden. Zur Auswertung der Bilder wurde das Programm ImageJ verwendet. Die beiden Kanäle des Fluoreszenzmikroskops wurden zunächst in RGB-Werte (rot-grün-blau) übersetzt. Die einzelnen Pixel der Aufnahmen im RHO-Kanal entsprechen dadurch den Farbwerten  $x/0/0$  und damit einem „roten Kanal“, die des FITC-Kanals  $0/y/0$  und damit einem „grünen Kanal“. Nach Vektoraddition besitzen die Pixel der überlagerten Bilder die Werte  $x/y/0$ . In Abbildung 4.28 sind die überlagerten Farbwerte auf der RGB-Skala von  $0/0/0$  bis  $255/255/0$  aufgezeigt. Man kann hier klar erkennen, dass im überlagerten Bild die roten Werte nur im Bereich zwischen  $50/0/0$  und  $255/100/0$  (oberhalb der gestrichelten Linie) mit dem bloßen Auge als „rot“ interpretiert werden können. Das liegt an der Tatsache, dass Menschen drei Arten von Zapfen als Rezeptoren in der Netzhaut für das visuelle Lichtspektrum besitzen. Von diesen drei Rezeptortypen sind S-Zapfen mit einem Sensitivitätsmaximum von etwa 420 nm für blaues Licht, M-Zapfen mit 534 nm für grünes Licht und L-Zapfen mit 564 nm für rotes Licht zuständig.<sup>[393]</sup> Da die Absorptionsbanden der M- und L-Zapfen überlappen, ist das menschliche Auge gegenüber grünem Licht empfindlicher als gegenüber rotem Licht. In der überlagerten RGB-Skala werden also Pixel mit hohem Grünanteil nicht als Rot wahrgenommen. Dies erhöht die Sensitivität des optischen Screening-Prozesses. Durch Analyse der überlagerten Bilder wird ein Aussortieren von stark grün fluoreszierenden Partikeln überflüssig, da diese erst als positive Hits ausgewertet werden können, wenn sie auch eine hohe Fluoreszenz im roten Kanal zeigen.

17

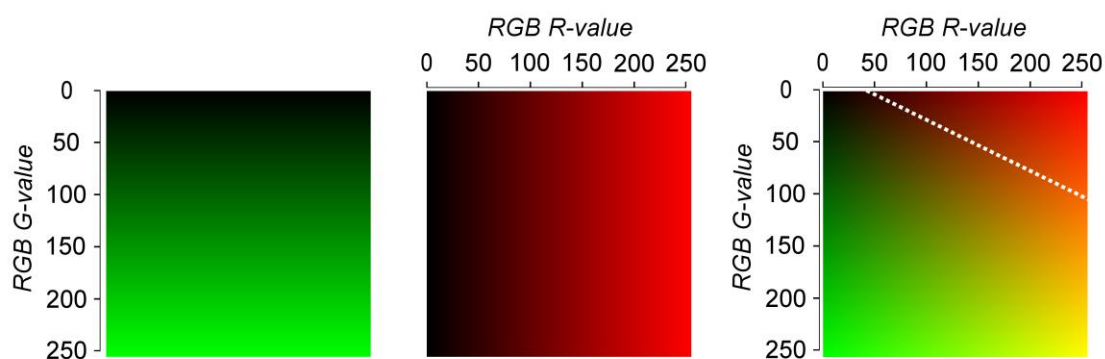


Abbildung 4.28: Überlagerte RGB-Farbskalen im grünen FITC-Kanal (links) mit RGB  $0/y/0$ , roten RHO-Kanal (Mitte) mit RGB  $x/0/0$  und kombinierte Werte (rechts). Rote Werte können nur rechts oben gefunden werden im Bereich von R-werten über 50 und G-Werten unter 100 (gepunktete weiße Linie).<sup>[1];[3]</sup>

Um zu validieren, dass dieser Effekt für ein Screening von Nutzen sein kann, wurde ein Modellsystem von sechs verschiedenen Peptiden 27-32 aus der Literatur mit bekannter Affinität zu Streptavidin synthetisiert. Die Peptide wurden so ausgewählt, dass sowohl mehrere Größenordnungen Unterschied zwischen den Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) lagen, als auch verschiedene physikochemische Eigenschaften und die Länge

<sup>17</sup> Abbildung übernommen mit freundlicher Genehmigung von RSC Publishing.<sup>[1]</sup>  
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ay/c5ay02981c>

der Peptide variierten.<sup>[300, 394-396]</sup> Tabelle 4.5 zeigt die ausgewählten Peptidsequenzen **27-32** mit den dazugehörigen bekannten  $K_d$ - und berechneten  $pK_a$ -Werten.

Tabelle 4.5: Ausgewählte Peptidsequenzen für die Assayvalidierung mit Affinität zu Streptavidin. Die berechneten  $pK_a$ -Werte wurden mit Hilfe des Innovagen peptide property calculator (<https://pepcalc.com/>) ermittelt.

Peptid	Sequenz ( C-Terminus links).	$K_d$ laut Quelle	berechneter $pK_a$	Quelle
<b>27</b>	DVEAWLDERVPLVET	$3.6 \pm 0.6$ nM	3.34	[394]
<b>28</b>	DVEAWLGER	$17 \pm 4$ nM	3.69	[394]
<b>29</b>	DVEAWIADPAVHFTT	$200 \pm 60$ nM	3.54	[395]
<b>30</b>	DLYKVPSHCHPMMP	$1.9 \pm 0.6$ $\mu$ M	7.08	[395]
<b>31</b>	AWRHPQFGG	37 $\mu$ M	10.91	[396]
<b>32</b>	HDHPQNL	282 $\mu$ M	6.04	[300]

Die Peptide wurden auf TentaGel-HMBA Macrobeads synthetisiert, wobei vor der ersten Aminosäure 6-Aminohexansäure an das Harz abgebracht wurde. Dieser Linker sollte die Zugänglichkeit der Liganden auf der Partikeloberfläche verbessern. Nach Anbringen der letzten Aminosäure und Abspalten der Seitenkettenschutzgruppen, wurden die Partikel mit Streptavidin inkubiert, das mit dem fluoreszierenden Farbstoff Dylight-550 (DL550) konjugiert worden war. DL550 besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und ein Emissionsmaximum bei 576 nm. Damit ist es möglich, diesen gelben Fluorophor im RHO-Kanal des verwendeten Fluoreszenzmikroskops abzubilden und Partikel, die das markierte Protein binden, zu detektieren. Die Partikel wurden vor der Aufnahme gründlich mit Puffer C gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen, und in eine 384-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Da ein Ablösen des Proteins von den Partikeln im Gleichgewicht nicht verhindert werden kann, ist es nötig, möglichst schnell Bilder aufzunehmen. Dies erfolgte mit Hilfe des automatisierten x/y-Kreuztisches des Mikroskops. Eine fünffache Vergrößerung stellte sich als optimal zum Abbilden einer ganzen Kavität der 384-Well Mikrotiterplatte heraus.

Kodadek *et al.* beschrieben die hier durchgeführten Schritte zur Inkubation, Aufnahme und Auswertung der Bilder schon in einer früheren Arbeit.<sup>[257]</sup> Diese wurden abgewandelt und auf die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien angepasst. In Abbildung 4.29 ist schematisch eine Übersicht des Screeningprozesses dargestellt.

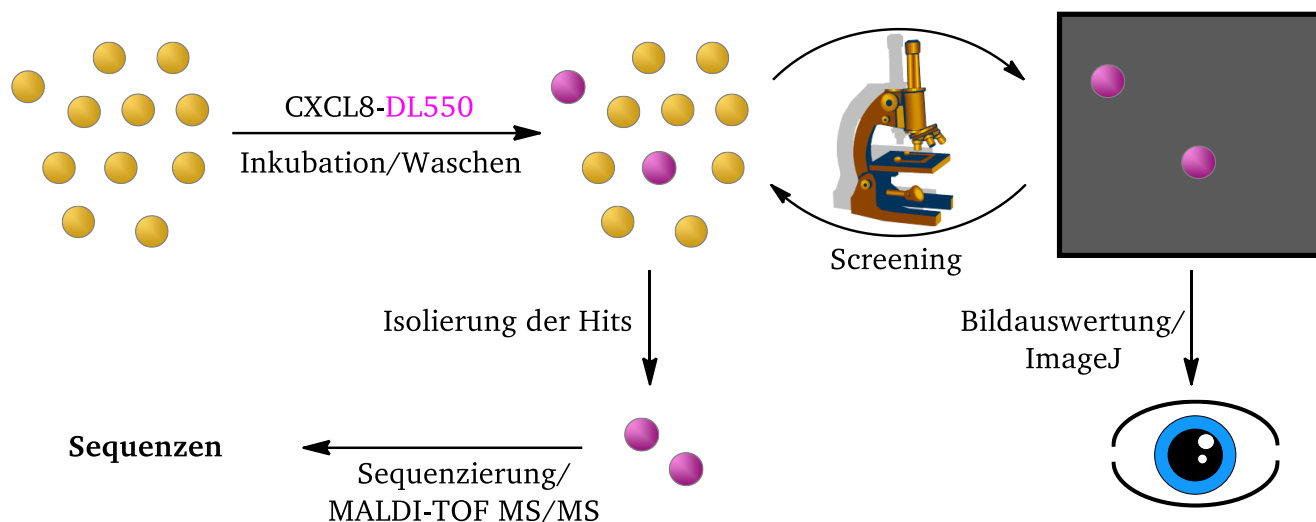


Abbildung 4.29: Schematische Übersicht über das fluoreszenzbasiertes Screening von OBOC-Bibliotheken. Die Bibliothek wird zunächst mit dem fluoreszenzmarkierten Zielmolekül inkubiert und gewaschen. Im Anschluss daran werden fluoreszierende Partikel unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert und aus der Bibliothek isoliert. Es folgt eine Sequenzierung der Liganden auf den positiven Hits.

In der Arbeit von Kodadek *et al.* wurde das Screening unter permanenter Belichtung der Partikel durchgeführt und es zeigte sich im Vergleich der positiven Hits mit der negativen Kontrolle, dass der Signalunterschied bei Verwendung eines einzelnen Fluoreszenzkanals teilweise sehr gering ausfällt. Unter Verwendung zweier Fluoreszenzkanäle und der Minimierung der Belichtungszeit, sollten weniger Fehler entstehen. Um die optimale Belichtungszeit im RHO-Kanal zu bestimmen, wurden als Positivkontrolle mit Biotin funktionalisierte TentaGel-HMBA Macrobeads **33** mit Streptavidin-DL550 inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unfunktionalisierte Partikel, die ebenfalls mit Strep-DL550 inkubiert wurden. Die Aufnahmen wurden bei steigenden Belichtungszeiten im RHO-Kanal aufgenommen. Die Belichtungszeit im FITC-Kanal wurde konstant bei 40 ms gehalten (Abbildung 4.30).



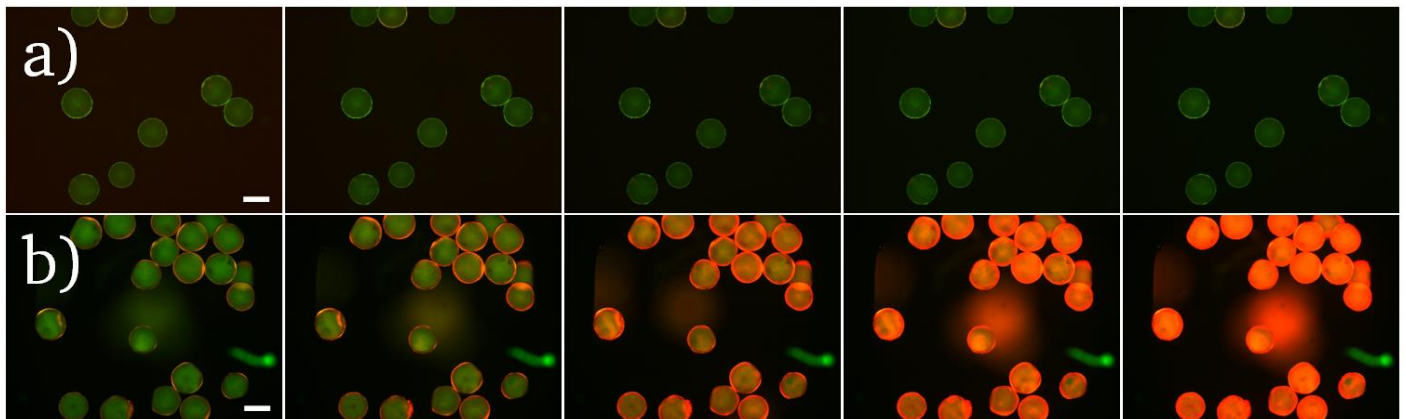


Abbildung 4.30: Unfunktionalisierte TentaGel-HMBA Macrobeads (a) und TentaGel-HMBA-Biotin **33** (b) nach Behandlung mit Streptavidin-DL550. Die Aufnahmen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop im FITC- und RHO-Kanal aufgenommen und überlagert. Die Belichtungszeiten im FITC-Kanal bleiben konstant bei 40 ms und steigen im RHO-Kanal von links nach rechts an (10 ms, 20 ms, 40 ms, 60 ms, 80 ms). Skala 300 µm.

Es wurde keine unspezifische Wechselwirkung zwischen Strep-DL550 und den TentaGel-HMBA Macrobeads festgestellt. Die TentaGel-HMBA-Biotin **33** Partikel zeigen schon bei niedrigen Belichtungszeiten im RHO-Kanal (10-40 ms) einen gut zu erkennenden Lichthof-Effekt, der als rote Korona um die Partikel auftritt. Die auf TentaGel immobilisierten Streptavidin bindenden Peptide **27-32** wurden daher im Folgenden zunächst bei Belichtungszeiten von 40 ms im RHO und FITC-Kanal aufgenommen. Als Kontrollen wurden zusätzlich TentaGel-HMBA Macrobeads und TentaGel-HMBA-Biotin Partikel **33** verwendet, (vgl. Abbildung 4.30) und alle Partikel wurden sowohl in Puffer C, in einer Streptavidin Lösung, in Streptavidin-DL550 und in einer Mischung mit der Negativkontrolle analysiert (Abbildung 4.31).

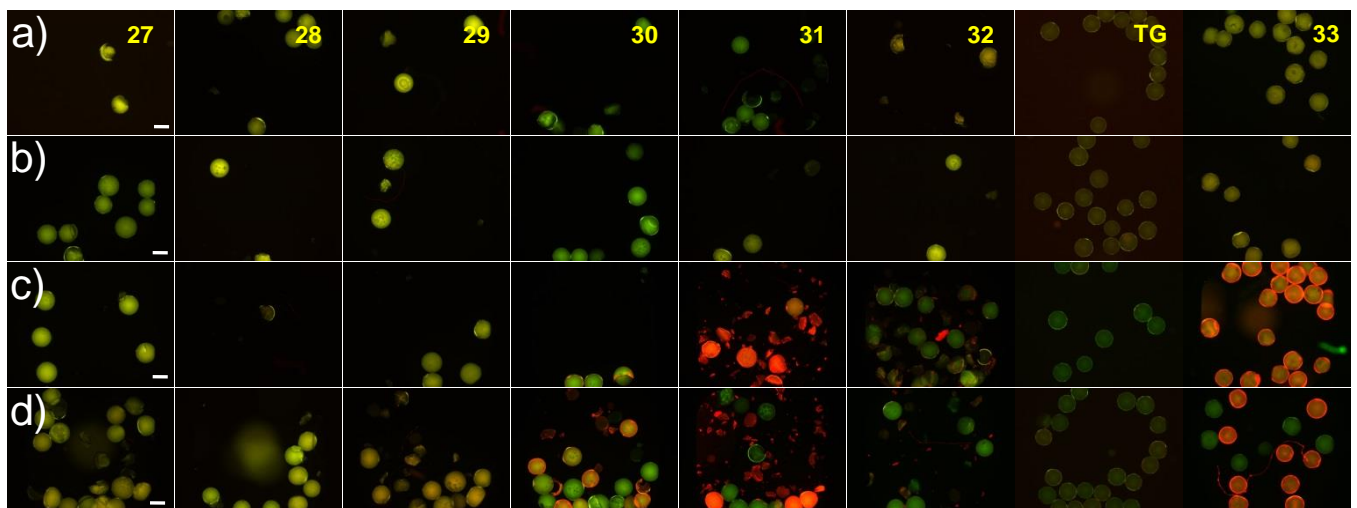


Abbildung 4.31: Bindungsexperiment mit Kontrollpeptiden **27-32**. Überlagerte Aufnahmen aus FITC- und RHO-Kanal in einer 384-Well Mikrotiterplatte mit jeweils 40 ms Belichtungszeit pro Kanal. Die Peptide **27-32** wurden in Puffer C (a), Streptavidin-Lösung (b) und Streptavidin-DL550-Lösung (c) inkubiert. Eine Mischung der mit Streptavidin-DL550 inkubierten Partikel (c) und der korrespondierenden Kontrolle (a) wurde aufgenommen, um den Kontrast zwischen Positiv- und Negativkontrolle abzubilden (d). Die Kontrollen mit TentaGel-HMBA Macrobeads (TG) und TentaGel-HMBA-Biotin (TG-Biotin) **33** sind in den beiden letzten Spalten zu sehen (rechts). Einige Partikel zeigen eine beträchtliche Autofluoreszenz im FITC-Kanal nach der Synthese und erscheinen intensiv grün. Selbst Partikel, die eine starke Fluoreszenz im FITC-Kanal begleitet durch eine schwache Fluoreszenz im RHO-Kanal zeigen, können leicht von positiven Partikeln unterschieden werden. Skala 300 µm.

Wie in Abbildung 4.31 gut zu erkennen ist, konnten die Peptide **27-29** nicht als Hits im Experiment identifiziert werden, obwohl sie laut Literatur die höchsten Affinitäten zu Streptavidin aufweisen (vgl. Tabelle 4.5). Wegen ihrer niedrigen  $pK_a$ -Werte sind diese Peptide bei physiologischem pH-Wert negativ geladen, was den Partikeln eine hohe negative Ladungsdichte auf der Oberfläche verleiht. Da der Farbstoff DyLight550<sup>18</sup> zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit vier Sulfonat-Gruppen enthält, verändert er die Nettoladung der Oberfläche von Streptavidin nach der Konjugation und es kommt zur Abstoßung zwischen Streptavidin-DL550 und den negativ geladenen Streptavidin-Bindepeptiden (Abbildung 4.32).

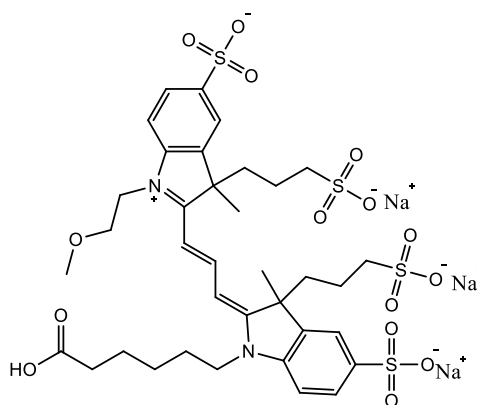


Abbildung 4.32: Struktur von DyLight550.

Um zu belegen, dass das negative Ergebnis des Bindungsexperimentes auf Ladungsabstoßung zwischen den Partikeln und dem Farbstoff zurückzuführen ist, wurden alle Partikel in eine 384-Well Mikrotiterplatte pipettiert, mit Streptavidin und TAMRA-Biotin **36** inkubiert und mit Puffer C gewaschen. TAMRA **24** zeigt ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie DL550, zeichnet sich aber durch eine positive Nettoladung aus. Die Bilder unter dem Mikroskop wurden bei jeweils 40 ms Belichtungszeit in beiden Kanälen aufgenommen und mit TentaGel-HMBA Macrobeads und TentaGel-HMBA-Biotin Partikeln **33** als Kontrollen verglichen (Abbildung 4.33).

<sup>18</sup> Thermo Fischer Scientific Handelsmarke

30

33

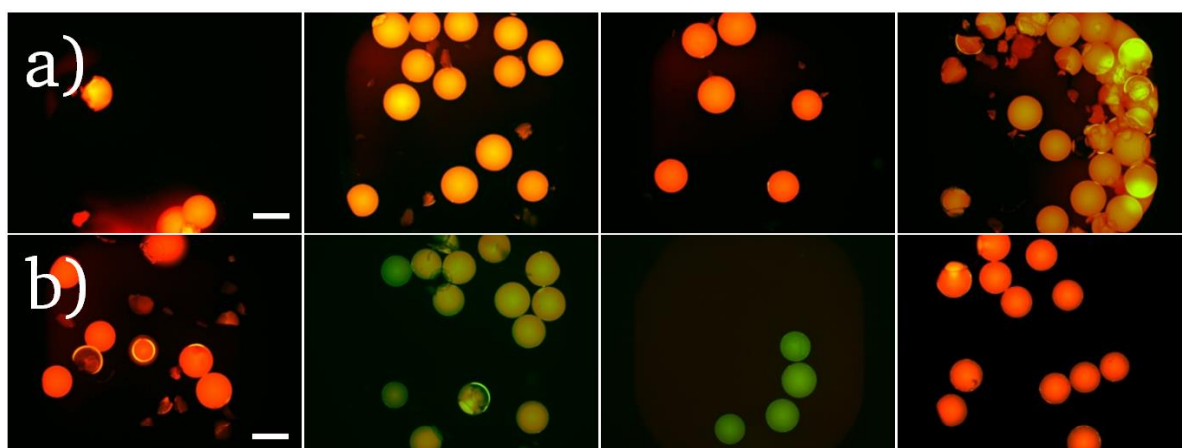


Abbildung 4.33: Kontrollexperiment mit a) Peptiden **27-30** und b) **31-32**, sowie TentaGel-HMBA Macrobeads und TentaGel-HMBA-Biotin **33** (jeweils von links nach rechts). Überlagerte Aufnahmen aus FITC- und RHO-Kanal in einer 384-Well Mikrotiterplatte mit jeweils 40 ms Belichtungszeit pro Kanal. Die Partikel wurden zunächst in einer Streptavidin Lösung inkubiert, in einer TAMRA-Biotin **36** Lösung markiert und anschließend gründlich mit DMF und Puffer C gewaschen. Die teilweise starke Intensität der Partikel mit Peptid **30** (rechte obere Ecke), lässt sich dadurch erklären, dass es zu Artefakten kommt wenn Partikel aufeinanderliegen,. Skala 300 µm.

Das Kontrollexperiment zeigte, dass die Peptide **27-29** an unmarkiertes Streptavidin binden; es ist daher davon auszugehen, dass es wie vermutet zu einer Ladungsabstoßung zwischen Streptavidin-DL550 und den anionischen Peptiden **27-29** auf der Oberfläche der Partikel kommt. Für Peptid **32** ist auch hier keine Bindung festzustellen. Da dieses laut Literatur das Peptid mit der geringsten Affinität zu Streptavidin ist ( $282 \mu\text{M}$ )<sup>[300]</sup>, kann davon ausgegangen werden, dass der Assay nicht sensitiv genug ist, um Liganden mit einer derart niedrigen Affinität zu detektieren (vgl. Abbildung 4.31 und Tabelle 4.5). Die bereits im ersten Experiment als Positive identifizierten Peptide **30** und **31** sind bei physiologischem pH-Wert neutral bzw. positiv geladen (vgl. Tabelle 4.5). Daher wurde ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt, um eine unspezifische Wechselwirkung des anionischen Farbstoffs DL550 mit einer positiven Partikeloberfläche auszuschließen. TentaGel-HMBA Macrobeads wurden mit Fmoc-Lys(Mtt)-OH funktionalisiert und sowohl nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc Schutzgruppe, als auch nach Abspaltung beider Schutzgruppen mit Streptavidin-DL550 inkubiert und mit Puffer C gewaschen. So wurden Partikel mit einer bei physiologischem pH-Wert kationischen (voll entschützt zwei positive Ladungen, mit Mtt eine positive Ladung) Oberfläche hergestellt. Diese wurden bei Belichtungszeiten von 40 ms in beiden Kanälen abgebildet (Abbildung 4.34).

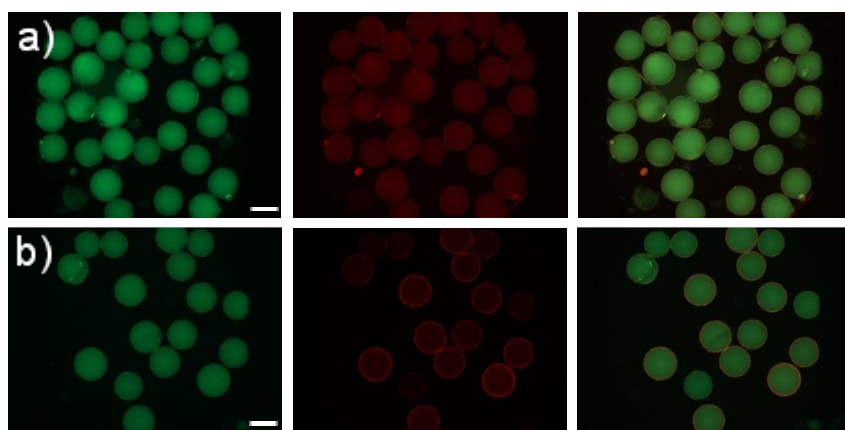


Abbildung 4.34: TentaGel-HMBA Macrobeads funktionalisiert mit a) Lysin-Mtt (eine positive Ladung) und b) Lysin (zwei positive Ladungen) und inkubiert mit Streptavidin-DL550. Die Bilder zeigen von links nach rechts den FITC-Kanal, RHO-Kanal und eine überlagerte Aufnahme. Die niedrige Fluoreszenz im RHO-Kanal kombiniert mit einer höheren Fluoreszenz im FITC-Kanal resultiert in der Überlagerung in einer grünen Färbung. Es sind keine falsch positiven Ergebnisse durch Wechselwirkung zwischen der stark positiven Partikeloberfläche und dem anionischen Streptavidin-DL550 zu erkennen. Skala 300  $\mu\text{m}$ , Belichtungszeit 40ms.

Im Kontrollexperiment mit positiv geladenen Partikeloberflächen konnte keine signifikante Rotfärbung durch elektrostatische Wechselwirkung mit Streptavidin-DL550 festgestellt werden, die das Screening stören könnte. Wie Abbildung 4.31 zeigt, sieht man lediglich eine leichte rötliche Korona um die Partikel, die aber aufgrund der geringen Intensität als unspezifisches Signal bewertet werden kann (vgl. Abbildung 4.30). Es können also mit dieser Screeningmethode positive Hits mit  $K_d$ -Werten von 40  $\mu\text{M}$  und darunter bei Belichtungszeiten von 40 ms identifiziert werden. Das Peptid **32** ( $K_d$  282  $\mu\text{M}$ ) zeigt nach Inkubation mit Streptavidin-DL550 keine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz im RHO-Kanal und markiert damit die Sensitivitätsgrenze dieser Screeningmethode. Peptid **31** zeigt im Screening trotz der relativ hohen Dissoziationskonstanten von 37  $\mu\text{M}$ <sup>[396]</sup> eine starke Fluoreszenz im roten Kanal, was vermutlich auf einen Aviditätseffekt an der Partikeloberfläche zurückzuführen ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass kleinere Sequenzen, die mit einer höheren Ausbeute und Reinheit auf den Partikeloberflächen synthetisiert werden, im Vergleich zu längeren Peptiden oder Peptoiden ein stärkeres Signal hervorrufen können. Es wurde somit gezeigt, dass diese Screeningmethode, unter Berücksichtigung des verwendeten Farbstoffs und des Zielmoleküls, für kleine Peptid- und Peptoidsequenzen geeignet ist. In weiterführenden Arbeiten wurde diese Methode dazu verwendet, Peptoid-Pentamer-<sup>20</sup> und Peptoid-Hexamer-OBOD-Bibliotheken<sup>21</sup> auf Affinität zu CXCL8-DL550 zu screenen, wobei 50 bzw. 29 Hits isoliert werden konnten, von denen bisher 18 als Liganden für CXCL8 bestätigt und auf biologische Aktivität hin charakterisiert wurden.<sup>[1, 3, 397]</sup>

<sup>19</sup> Abbildung übernommen mit freundlicher Genehmigung von RSC Publishing.<sup>[1]</sup>

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ay/c5ay02981c>

<sup>20</sup> Teil der Masterthesis von Julia Susanne Wack. Durchgeführt im AK Schmitz, TU Darmstadt.

<sup>21</sup> Teil der Dissertation von Dr. Dorothea Helmer. Durchgeführt im AK Schmitz, TU Darmstadt.

### 4.3.2. Magnetseparations-Screening

Eine weitere Screeningmethode, die in dieser Arbeit weiterentwickelt und validiert werden sollte, ist die magnetische Selektion von immobilisierten Liganden aus einer OBOC-Bibliothek mit Hilfe von an Magnetpartikeln konjugierten Zielmolekülen. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber dem fluoreszenzbasierten Screening ist, dass die Identifikation und Isolierung der Hits einer Bibliothek in einem Schritt durchgeführt werden und dadurch Arbeitsschritte eingespart werden können. Eine schematische Übersicht der Screeningmethode ist in Abbildung 4.35 gezeigt.

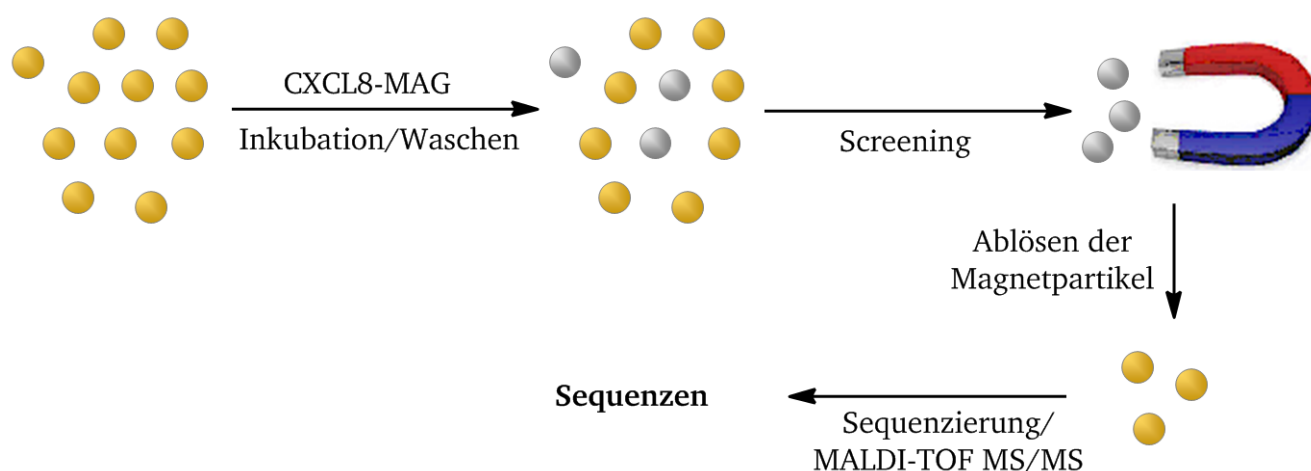


Abbildung 4.35: Schematische Übersicht über ein magnetpartikelbasiertes Screening von OBOC-Bibliotheken. Die Bibliothek wird zunächst mit dem an Magnetpartikel konjugierte Zielmolekül inkubiert und gewaschen. Im Anschluss daran werden die positiven Hits von allen anderen Partikeln im Magnetfeld getrennt. Es folgt das Ablösen der Magnetpartikel vom Syntheseharz und eine Sequenzierung der Liganden auf den positiven Partikeln.

Schwierigkeiten beim magnetpartikelbasierten Screening stellen die Konjugation des Zielmoleküls an die Magnetpartikel, sowie unspezifische Wechselwirkungen zwischen Zielmolekül und Syntheseharz und auch das Ablösen der Magnetpartikel von den positiven Hits dar. In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits verschiedene Methoden zur kovalenten Immobilisierung von CXCL8 an MPVA-C22 Magnetpartikeln untersucht.<sup>[3, 398]</sup> Ergebnisse dieser Arbeiten zeigten, dass es zwar möglich ist, CXCL8 kovalent an die Oberfläche von Magnetpartikeln anzubringen, aber wegen zu geringer Beladungsdichten der Partikel und unspezifischer Wechselwirkungen mit beschädigtem Syntheseharz diese Methode nicht für das Screening einer Bibliothek geeignet ist. Es wurde gezeigt, dass viele falsch Positive dadurch generiert werden, dass sich Magnetpartikel in Rissen des Syntheseharzes festsetzen, sodass diese beschädigten Partikel ebenfalls im Magnetfeld mobilisiert werden können (Abbildung 4.36). Wegen der geringen Anzahl von Magnetpartikeln auf der Oberfläche der identifizierten Hits, die aus der niedrigen Beladungsdichte der Magnetpartikel mit CXCL8 resultierte, waren falsch positive von wirklichen Hits mikroskopisch oft nicht voneinander zu unterscheiden.<sup>22</sup>

<sup>22</sup> Durchgeführt von Julia Susanne Wack im Forschungspraktikum, AK Schmitz, TU Darmstadt.

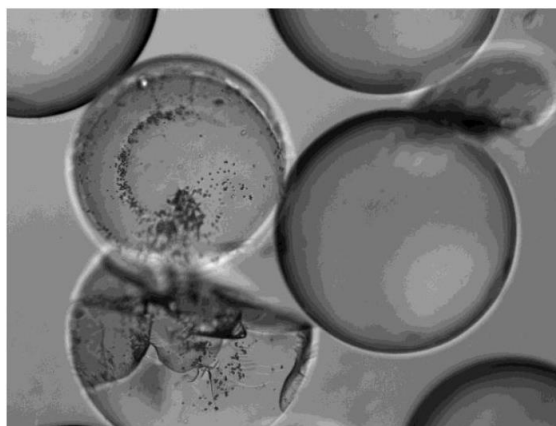


Abbildung 4.36: TentaGel-HMBA Macrobeads funktionalisiert mit IL8RPLoopsQ **5** und inkubiert mit MPVA-C22-MIP-IL8 **34**. Zwei beschädigte Partikel (links) ließen sich im Magnetfeld mobilisieren, da Magnetpartikel in Risse des Syntheseharzes eindringen konnten.

In einer Arbeit von Mendes *et al.* wurde ein optimiertes Protokoll zur Magnetseparation von Hits aus OBOC-Bibliotheken erstellt (vgl. Abbildung 4.37).<sup>[259]</sup> Mit Streptavidin beschichtete magnetische Partikel wurden mit einem Biotin-Zielmolekül-Konjugat inkubiert, wodurch die Beladungsdichte der Magnetpartikel im Gegensatz zur kovalenten Methode erhöht wurde. Unspezifische Wechselwirkungen wurden durch Zusatz von Tween-20 im Puffer reduziert. Dieses Protokoll wurde in dieser Arbeit in abgewandelter Form für ein Modellsystem mit auf TentaGel-HMBA Macrobeads immobilisierten Streptavidin bindenden Peptiden **27-32** angewandt (vgl. Tabelle 4.5).

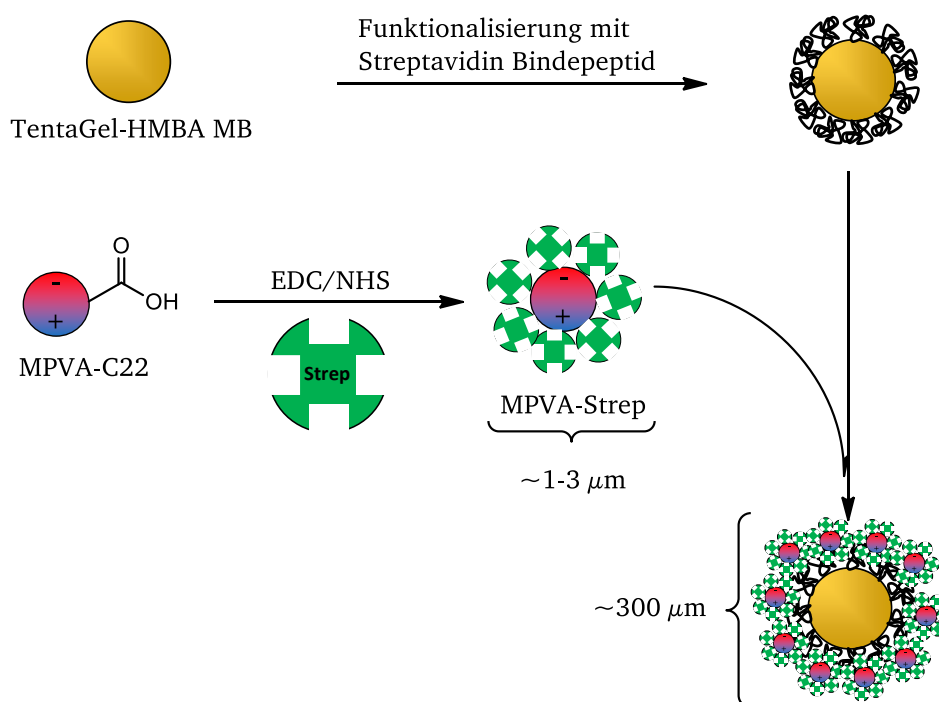


Abbildung 4.37: Schematische Darstellung der Beschichtung von MPVA-C22 Magnetpartikeln mit Streptavidin und Bindung dieser an immobilisierte Streptavidin-Bindepeptide **27-32** auf TentaGel-Syntheseharz.



Die für diese Arbeit ausgewählten MPVA-C22 Partikel sind superparamagnetische Magnetitpartikel in einer Polyvinylalkohol-Matrix mit einer Größe von 1 bis 3  $\mu\text{m}$ . Sie werden in Folgenden vereinfacht als Magnetpartikel bezeichnet. Die Magnetpartikel wurden mit EDC/NHS aktiviert und anschließend mit Streptavidin kovalent beschichtet. Sie wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Waschen mit dem für die Screenings verwendeten Puffer auf Aggregation und unspezifische Wechselwirkungen untersucht (Abbildung 4.38). Es wurden unfunktionalisierte Magnetpartikel und Partikel mit Streptavidinbeschichtung **35** mit TAMRA-Biotin **36** inkubiert und sowohl im Hellfeld als auch im RHO-Kanal abgebildet. Es ist klar zu erkennen, dass die Partikel keine Autofluoreszenz im RHO-Kanal zeigen und lediglich die mit Streptavidin funktionalisierten Magnetpartikel mit TAMRA-Biotin **36** angefärbt werden können. Es ist sowohl vor als auch nach der Beschichtung der Partikel mit Streptavidin keine Aggregation festzustellen.

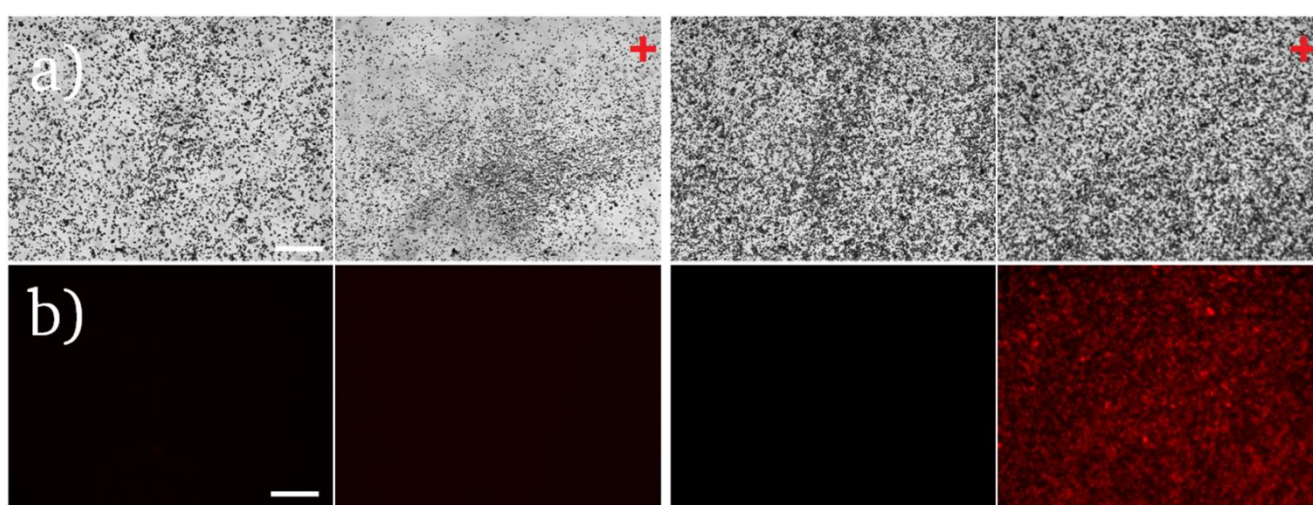


Abbildung 4.38: MPVA-C22 Magnetpartikel unter dem Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld (a) und RHO Kanal (b). Links sind unfunktionalisierte Partikel ohne und mit Inkubation (+) in TAMRA-Biotin **36** abgebildet. Rechts sind MPVA-Streptavidin Partikel **35** ohne und mit Inkubation (+) in TAMRA-Biotin **36** zu sehen. Skala: 100  $\mu\text{m}$ .

Um einen Eindruck von der Homogenität der Beladung der Partikeloberfläche des verwendeten TentaGel-HMBA MB Harzes zu erhalten, wurde dieses mit Biotin funktionalisiert **37** und in einer MPVA-Streptavidin **35** Suspension inkubiert. Es wurde eine Kontrolle mit unfunktionalisiertem TentaGel-HMBA MB Harz durchgeführt, um auf unspezifische Wechselwirkungen der beiden Partikelarten zu kontrollieren. Die größeren Syntheseharz-Partikel wurden aus der Suspension isoliert und unter dem Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld untersucht. Die Bilder mussten mit mindestens zwei Fokussierungen aufgenommen werden, damit sowohl der Boden des Wells und die Unterseite des Syntheseharzes als auch die Oberseite des Harzes mit eventuell anhaftenden Magnetpartikeln scharf abgebildet werden konnten. Wie auf den Bildern gut zu erkennen ist, zeigte die Kontrolle mit unfunktionalisiertem TentaGel-HMBA MB Harz keine Wechselwirkung mit den mit Streptavidin beschichteten Magnetpartikeln **35** (Abbildung 4.39). Nur einige wenige Magnetpartikel liegen auf der Oberfläche des Harzes. Die größeren Ansammlungen der Magnetpartikel auf der Harzunterseite lassen sich dadurch erklären, dass diese unter dem Harz festgehalten wurden, als es sich am Boden der Wells absetzte. Das mit Biotin funktionalisierte TentaGel-HMBA Harz zeigt hingegen eine wesentlich größere Ansammlung der Magnetpartikel auf seiner Oberfläche mit einer sehr homogenen



Verteilung. Das Syntheseharz war nach der Inkubation sichtlich dunkler als das Kontrollharz und ließ sich mit einem Handmagneten mobilisieren.

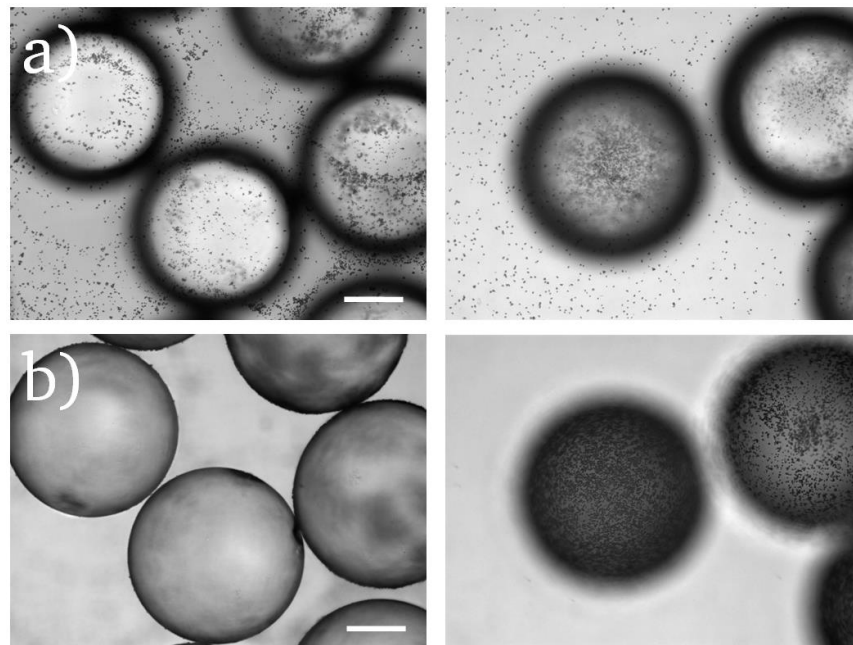


Abbildung 4.39: TentaGel-HMBA MB (links) und TentaGel-HMBA MB funktionalisiert mit Biotin **33** (rechts) inkubiert mit MPVA-Streptavidin-Magnetpartikeln **35**. Die Bilder wurden im Hellfeld-Kanal in zwei unterschiedlichen Fokusebenen aufgenommen. a) Fokus am Boden der Mikrotiterplatte; b) Fokus auf der Partikeloberfläche. Skala: 100 µm

Die auf TentaGel immobilisierten Streptavidin bindenden Peptide **27-32** wurden zunächst in Puffer C + 0.1 % Tween-20 gequollen und mit den MPVA-Strep Partikeln **35** inkubiert. Als Kontrollen wurden zusätzlich TentaGel-HMBA Macrobeads (Negativkontrolle) und TentaGel-HMBA-Biotin Partikel **33** (Positivkontrolle) verwendet. Es wurden Hellfeldaufnahmen der Partikelsuspensionen am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen, um die Verteilung der Magnetpartikel auf der Oberfläche des Syntheseharzes zu untersuchen (Abbildung 4.40). Wie auf den Aufnahmen zu erkennen ist, binden die MPVA-Strep Partikel **35** lediglich an die Streptavidin bindenden Peptide **30, 31** und die Positivkontrolle. Dabei konnten nur die Positivkontrolle und das Harz mit Peptid **31** mit einem Handmagneten im Magnetfeld mobilisiert werden.

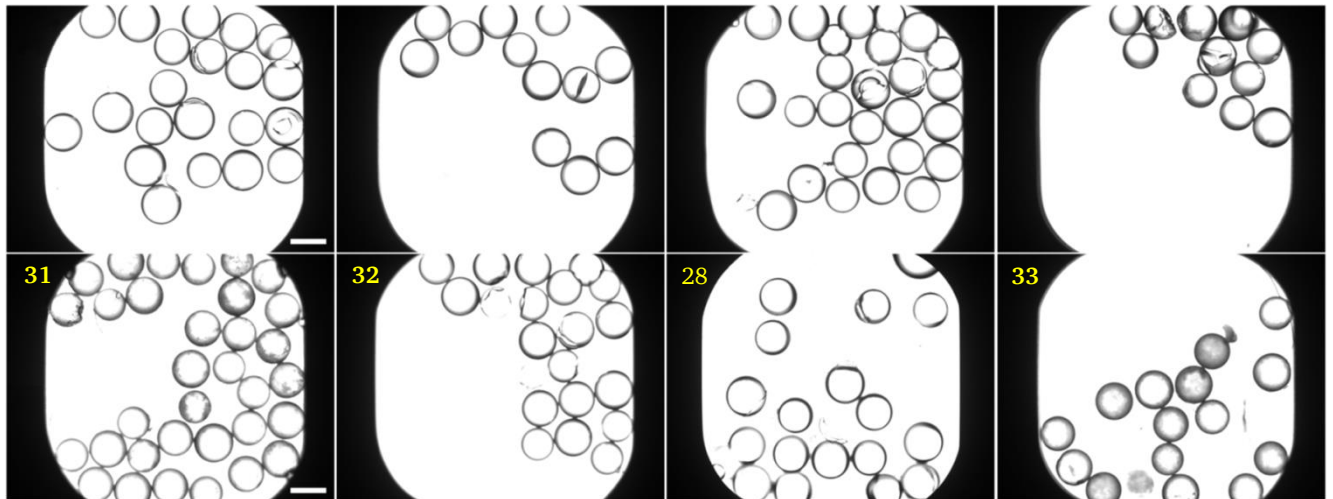


Abbildung 4.40: Auf TentaGel-HMBA Macrobeads immobilisierte Streptavidin bindende Peptide **27–32**, sowie Negativkontrolle und TentaGel-HMBA-Biotin **33** inkubiert mit MPVA-Strep Magnetpartikeln **35**. Die Bilder wurden bei 5x Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld-Kanal aufgenommen. Dunkle Stellen auf dem Syntheseharz zeigen eine Bindung von Magnetpartikeln an, wie bei Peptid **30**, Peptid **31** und Biotin **33** zu erkennen ist. Skala: 300 µm.

Bei höherer Vergrößerung ist gut zu erkennen, dass keine Magnetpartikel auf der Oberfläche der Harze mit den Peptiden **27–29** und **32** koordiniert werden konnten. Peptid **30** zeigt nur wenige fleckenartige Ansammlungen von Magnetpartikeln auf der Oberfläche, die bei Peptid **31** häufiger auftreten (Abbildung 4.41). Nur die Positivkontrolle mit Biotin **33** zeigte eine homogene Verteilung der Magnetpartikel auf der Oberfläche der Mehrzahl der Partikel (vgl. Abbildung 4.39).

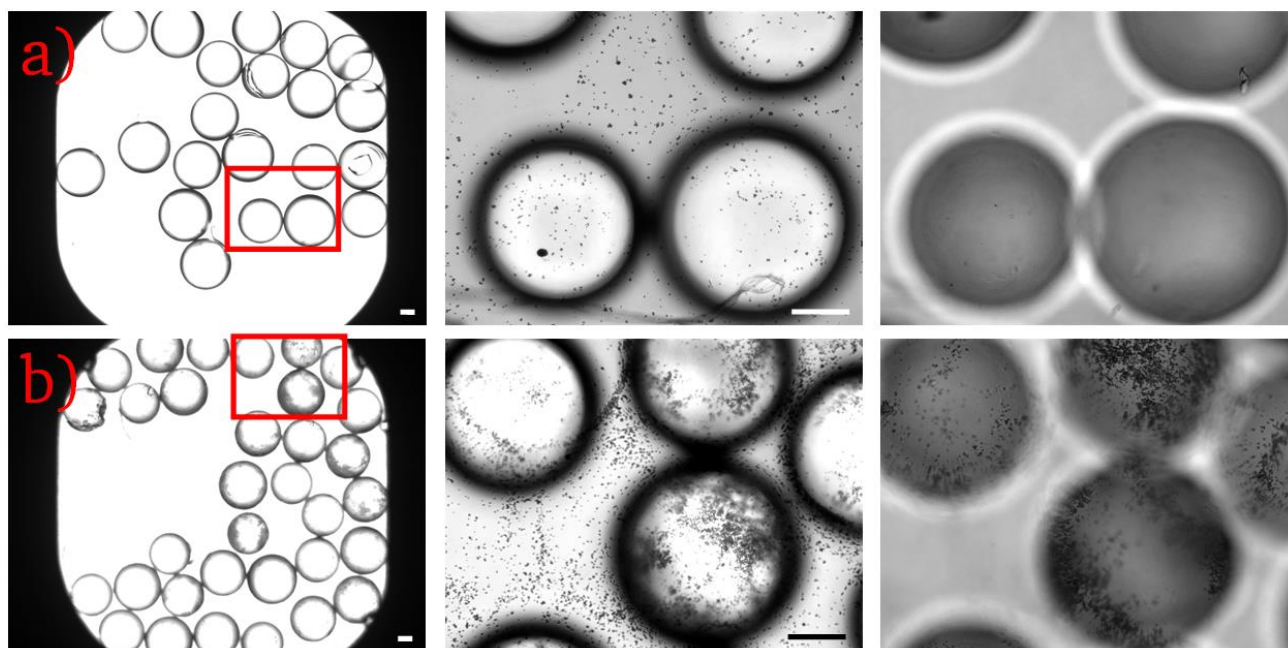


Abbildung 4.41: Auf TentaGel-HMBA Macrobeads immobilisierte Streptavidin bindende Peptide **27** (a) und **31** (b). Die Bilder wurden bei 5x Vergrößerung (links) und 20x Vergrößerung (Mitte, rechts) unter dem Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld-Kanal aufgenommen. Bei den mittleren Aufnahmen wurde der Fokus auf den Boden der Kavität der 384-Well Mikrotiterplatte eingestellt, um die Unterseite der Partikel abzubilden, bei den Aufnahmen auf der rechten Seite wurde auf die Oberseite der Partikel fokussiert. Die roten Kästen zeigen den Bereich der vergrößerten Aufnahmen. Es konnte keine Bindung auf der Oberfläche von **27** nachgewiesen werden. Die Menge der Magnetpartikel auf **31** reicht aus, um diese im Magnetfeld zu mobilisieren. Skala: 100 µm.

Um die Wirkung der mit Streptavidin beschichteten Magnetpartikel **35** auf biotinylierte Zielmoleküle zu untersuchen, wurden diese mit CXCL8-Biotin **4** inkubiert und Experimente an lebenden Zellen durchgeführt, die den CXCR1-Rezeptor als Bindungspartner für CXCL8 tragen. Als Modellzellen wurden drei verschiedene Zellsuspensionen ausgewählt, zwei kultivierbare Zelllinien und Primärzellen. Als kultivierbare Zelllinien dienten mit CXCR1 transfizierte HEK293-Zellen sowie HEK293-Zellen, die ein CXCR1-EGFP-Fusionsprotein exprimieren<sup>23,24</sup>. Das Vorhandensein des Rezeptors wurde in der Dissertation von Marina Jöst nachgewiesen.<sup>[399]</sup> Isolierte neutrophile Granulozyten<sup>25</sup> mit nachgewiesener Aktivität<sup>[335]</sup> dienten als Primärzellen. Als Kontrolle für unspezifische Wechselwirkungen mit Streptavidin wurden die Zellen mit MPVA-Strep Partikeln **35** behandelt (Abbildung 4.42).

<sup>23</sup> Zellen wurden von Jean-Luc Galzi vom Centre National de Recherche Scientifique et Technologique | CNRST · Ecole de Biotechnologie de Strasbourg zur Verfügung gestellt.

<sup>24</sup> Transfektion durchgeführt von Dr. Marina Jöst im AK Schmitz, TU Darmstadt.

<sup>25</sup> Isolierung der Zellen durchgeführt von Dr. Ina Rink im AK Schmitz, TU Darmstadt.

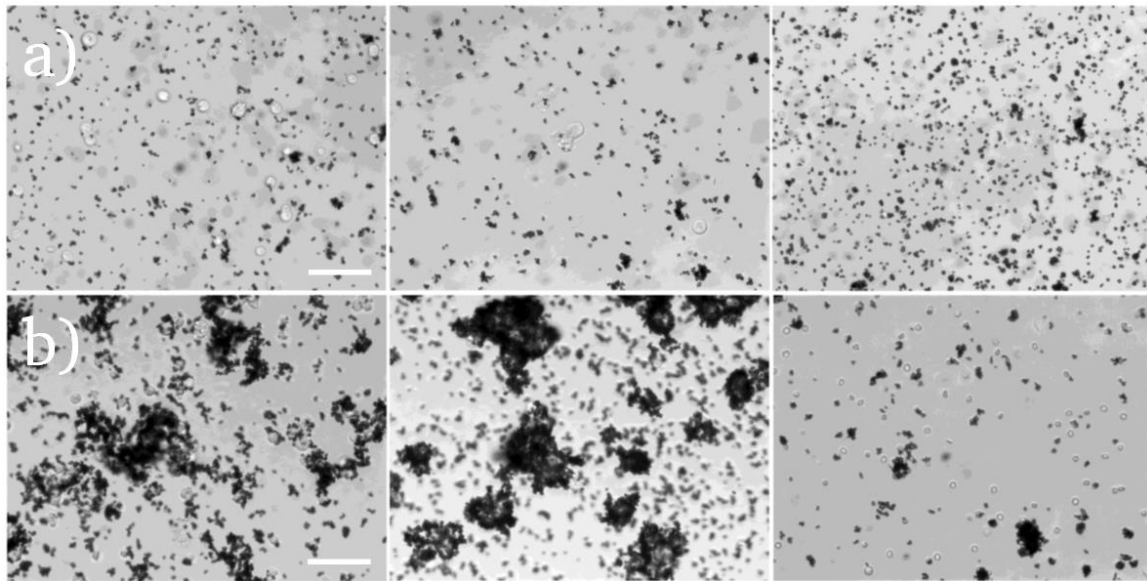


Abbildung 4.42: HEK293-Zellen, die mit Gen für CXCR1 transfiziert wurden (links), HEK293-Zellen mit dem Gen für ein CXCR1-EGFP-Fusionsprotein transfiziert (Mitte) und neutrophile Granulozyten aus Spenderblut (rechts). Die Zellen wurden als Kontrolle mit MPVA-Strep-Magnetpartikeln **35** (a) inkubiert. Bei Inkubation der Zellen mit IL8-Biotin beladenen MPVA-Strep-Magnetpartikeln (b) ist klar zu erkennen, dass diese die CXCR1 exprimierenden Zellen umschließen und Aggregate bilden. Skala: 100  $\mu\text{m}$ .

Die Experimente zeigen, dass eine Bindung der Magnetpartikel an die Zellen stattfindet und dass diese nicht auf unspezifische Wechselwirkungen mit dem Streptavidin auf den Partikeln zurückzuführen ist. Neben Partikel-Zell-Aggregaten können vereinzelt Zellen ohne Partikel in der Suspension beobachtet werden. Diese wurden vermutlich bei den vorangegangenen Verdünnungsschritten durch Scherkräfte in der Pipettenspitze von den Magnetpartikeln getrennt. Es wurde weiterhin untersucht, ob es möglich ist, mit dieser Methode neutrophile Granulozyten aus Vollblut zu isolieren. Eine Blutprobe wurde eine Stunde mit CXCL8-Biotin beladenen Magnetpartikeln inkubiert. Die Magnetpartikel wurden im Magnetfeld eines Handmagneten separiert und mehrfach mit Puffer gewaschen. Ein Teil der Partikel wurde abgenommen und verdünnt, anschließend wurden Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld-Kanal aufgenommen. Als Kontrolle für unspezifische Wechselwirkungen mit Streptavidin wurden MPVA-Strep Partikel **35** verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode CXCR1 exprimierende Zellen als Magnetpartikel-Zell-Aggregate aus einer Vollblut-Probe isoliert werden können (Abbildung 4.43). Trotz einiger Waschschrte sind dabei allerdings noch wenige andere Zellen, wie zum Beispiel Erythrozyten, in der Suspension zu finden. Da dies sowohl in der Negativkontrolle mit unfunktionalisierten Magnetpartikeln, als auch im Experiment auftrat, wird davon ausgegangen, dass diese mit der Strömung der Magnetpartikel mitgerissen und zwischen ihnen fixiert werden.



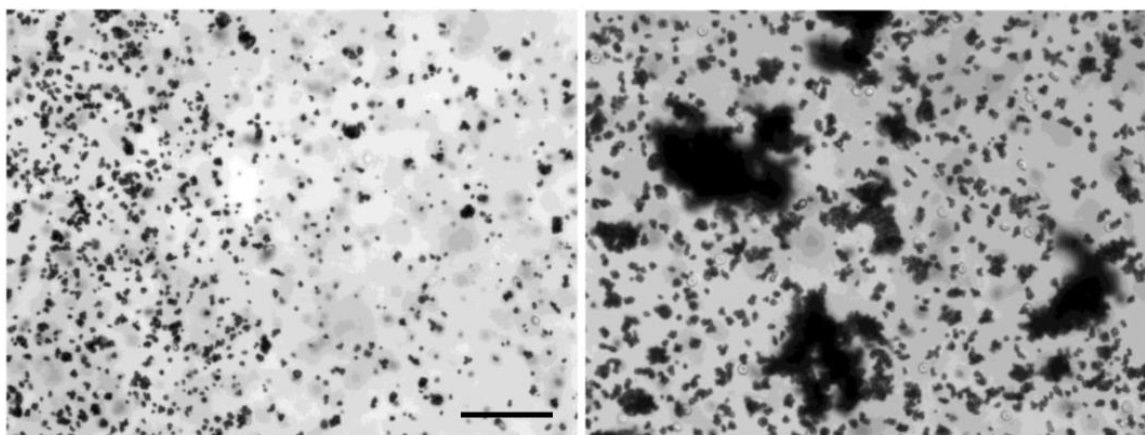


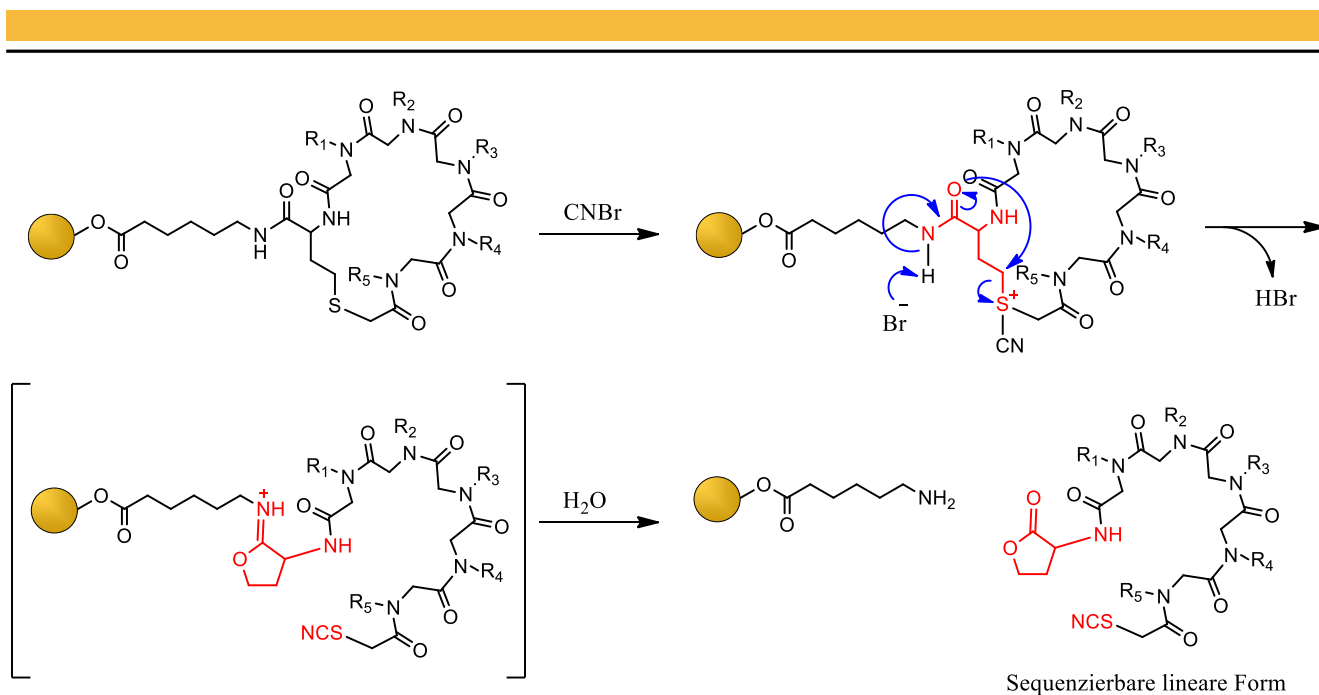
Abbildung 4.43:

Isolation von neutrophilen Granulozyten aus einer Vollblutprobe mittels Magnetseparation durch Bindung von CXCL8-Biotin **4** beladenen MPVA-Strep-Magnetpartikeln **35** (rechts). Kontrolle mit MPVA-Strep-Partikeln **35** im Vollblut (links). Bei Inkubation der mit CXCL8-Biotin beladenen Magnetpartikel mit Blut und anschließendem Waschen und Verdünnen (rechts) ist klar zu erkennen, dass die CXCR1 exprimierenden Zellen umschlossen werden und Aggregate bilden. Es sind vereinzelte Erythrozyten am Boden des Wells zu erkennen, die nicht ausgewaschen werden konnten. Skala: 100  $\mu$ m.

Es wurde durch die

Kontrollexperimente gezeigt, dass diese magnetpartikelbasierte Methode dazu geeignet ist, Proteinliganden aus OBOC-Bibliotheken zu erkennen und diese gleichzeitig zu isolieren.

Als Konzeptbeweis wurde schließlich eine OBOC-Bibliothek zyklischer Peptoid-Pentamere **38**, bestehend aus 100.000 Substanzen, synthetisiert (vgl. Kapitel 4.4.1). Die Seitenketten wurden einerseits nach der kommerziellen und synthetischen Zugänglichkeit der für die Synthese verwendeten primären Amine, sowie nach dem Vorkommen der entsprechenden Aminosäuren in den bekannten CXCL8-bindenden Peptiden IL8RPLoopsE **6** und CXCR1-p1 **15** ausgewählt. Bei der Sequenzierung durch MALDI-TOF MS/MS würde bei zyklischen Peptiden zwar die nötige Fragmentierung ablaufen, dadurch würde aber lediglich der Ring an dieser Stelle geöffnet werden, was nur ein Signal der Molekülmasse zur Folge hätte.<sup>[400]</sup> Wenn eine direkte Sequenzierung der synthetisierten Substanzen nicht möglich ist, wird normalerweise eine Markierung (z.B. lineare Peptoide<sup>[329, 401]</sup>, Peptide<sup>[308]</sup> oder Nanopartikel<sup>[402]</sup>) verwendet, um die Sequenz während der Synthese zu kodieren. Als alternative Strategie zur Linearisierung der Peptomere während der Abspaltung vom Harz, kann in einer zyklischen OBOC-Peptomer-Bibliothek nach Lee et al. Fmoc-hCys(Trt)-OH als Linker eingesetzt werden. Das Homo-Cystein als Verknüpfungspunkt für den N-Terminus am Ende der Synthese lässt eine Spaltung des Thioethers und gleichzeitige Abspaltung des Peptomers vom Harz mit Bromcyan (BrCN) zu. Das resultierende linearisierte Peptomer lässt sich daraufhin durch MALDI TOF MS/MS fragmentieren und sequenzieren. Dieses Verfahren von Lee *et al.* ist in Schema 4.2 dargestellt.<sup>[400]</sup>



Schema 4.2: Gleichzeitige Abspaltung und Linearisierung zyklischer Peptomere zur Sequenzierung mittels MALDI TOF MS/MS. In rot ist der Homocystein-Linker hervorgehoben, der durch intramolekulare Zyklisierung den Peptomer-Makrozyklus aufspaltet.

Nach dem letzten Schritt der Mix-and-Split Synthese der OBOC-Bibliothek und der Zyklisierung der Substanzen nach diesem Verfahren, wurden alle Partikel vereinigt und gewaschen. In einem ersten „Counter-Screening, konnten durch Inkubation der Bibliothek mit MPVA-Strep Partikeln **35** und anschließender Entfernung der überschüssigen Magnetpartikel und Magnetpartikel-Harz-Aggregate unspezifisch bindende Harzfragmente, sowie Bindungspartner für Streptavidin in einem Schritt aus der Bibliothek entfernt werden. Die Partikel wurden daraufhin mit einer 4 M Guanidinium\*HCl-Lösung (pH 7) mit 50 mM Mercaptoethanol behandelt, um Magnetpartikel und Syntheseharz voneinander zu trennen. Die abgetrennten Syntheseharz-Partikel wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und unter dem Mikroskop untersucht (Abbildung 4.44).

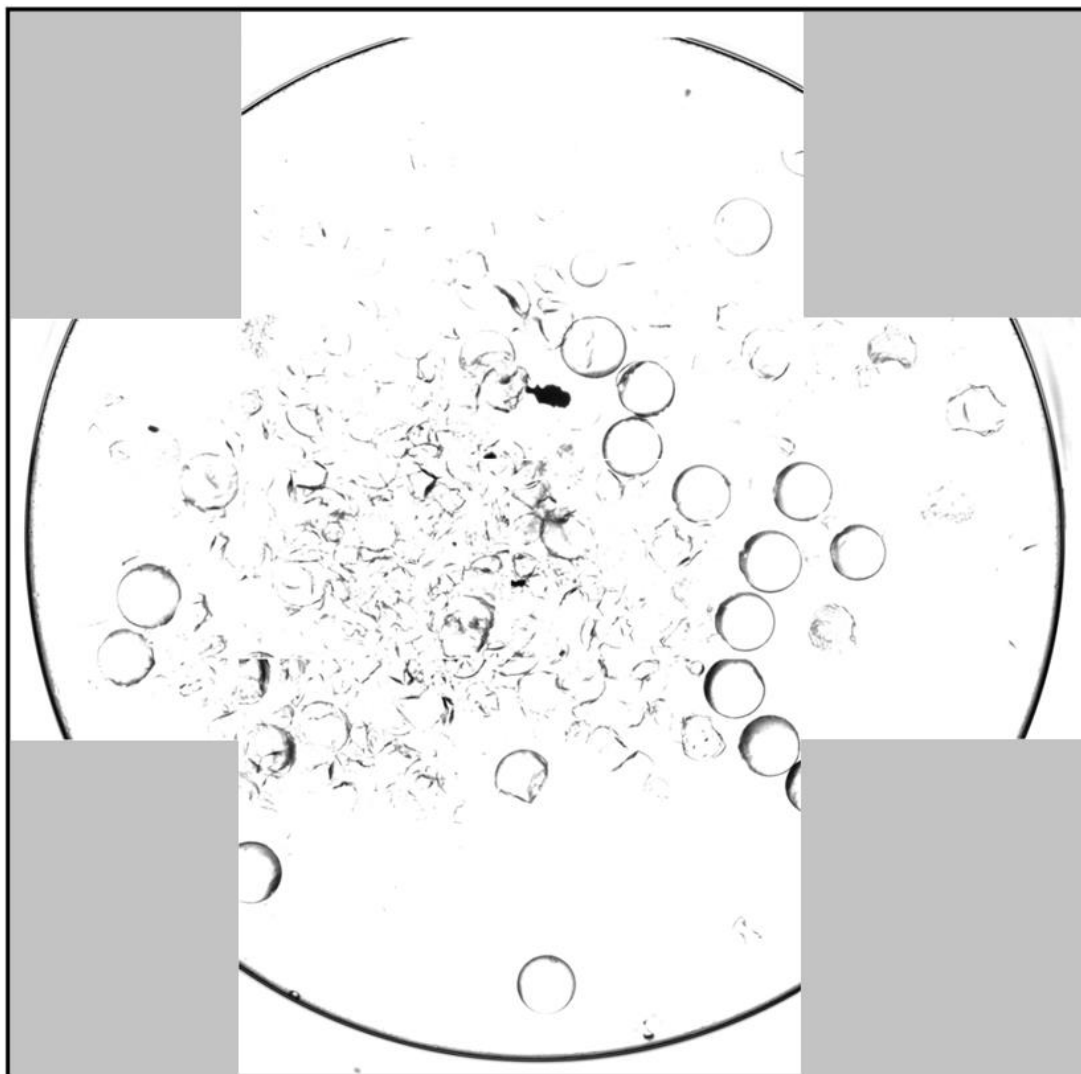


Abbildung 4.44: Aussortierte Partikel einer OBOC-Bibliothek mit Affinität zu Streptavidin bzw. unspezifischer Bindung zu den verwendeten MPVA-Strep Magnetpartikeln **35**. Hellfeldbilder wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 5x Vergrößerung in einer 96-Well Mikrotiterplatte aufgenommen. Es wurden vier Aufnahmen an verschiedenen Positionen des Wells vorgenommen und das Bild im Anschluss zusammengesetzt. Nicht dokumentierte Bereiche sind in grau unterlegt.

Wie gut zu erkennen ist, konnten eine Reihe von unspezifischen Bindungspartnern, die das Screening beeinflusst hätten, im Vorfeld von der Bibliothek getrennt werden. Diese bestanden zum Großteil aus Harzpartikeln, die bei der Synthese oder der Nachbehandlung des Syntheseharzes zerbrochen sind. Durch die Behandlung der Partikel mit dem denaturierenden Puffer, konnten die MPVA-Strep Partikel **35** von den Partikeln der Bibliothek getrennt werden. Diese Magnetpartikel können aufgrund der Denaturierung von Streptavidin für weitere Screenings nicht wieder eingesetzt werden und müssen verworfen werden.

Nach Inkubation der verbleibenden Bibliothek mit CXCL8-Biotin **4** und anschließendem Screening nach der oben beschriebenen Methode mit frisch präparierten MPVA-Strep Partikeln **35**, konnten 22 Hits gegen CXCL8 isoliert werden. Als Hit wurden Partikel betrachtet, die eine größtenteils intakte Oberfläche mit gleichmäßiger Verteilung an Magnetpartikeln aufweisen. Wie in Abbildung 4.45 zu erkennen ist, sind beim



Screening auch einige wenige Bruchstücke zerstörter Harzpartikel selektiert worden, während der Großteil der Partikel intakt ist.

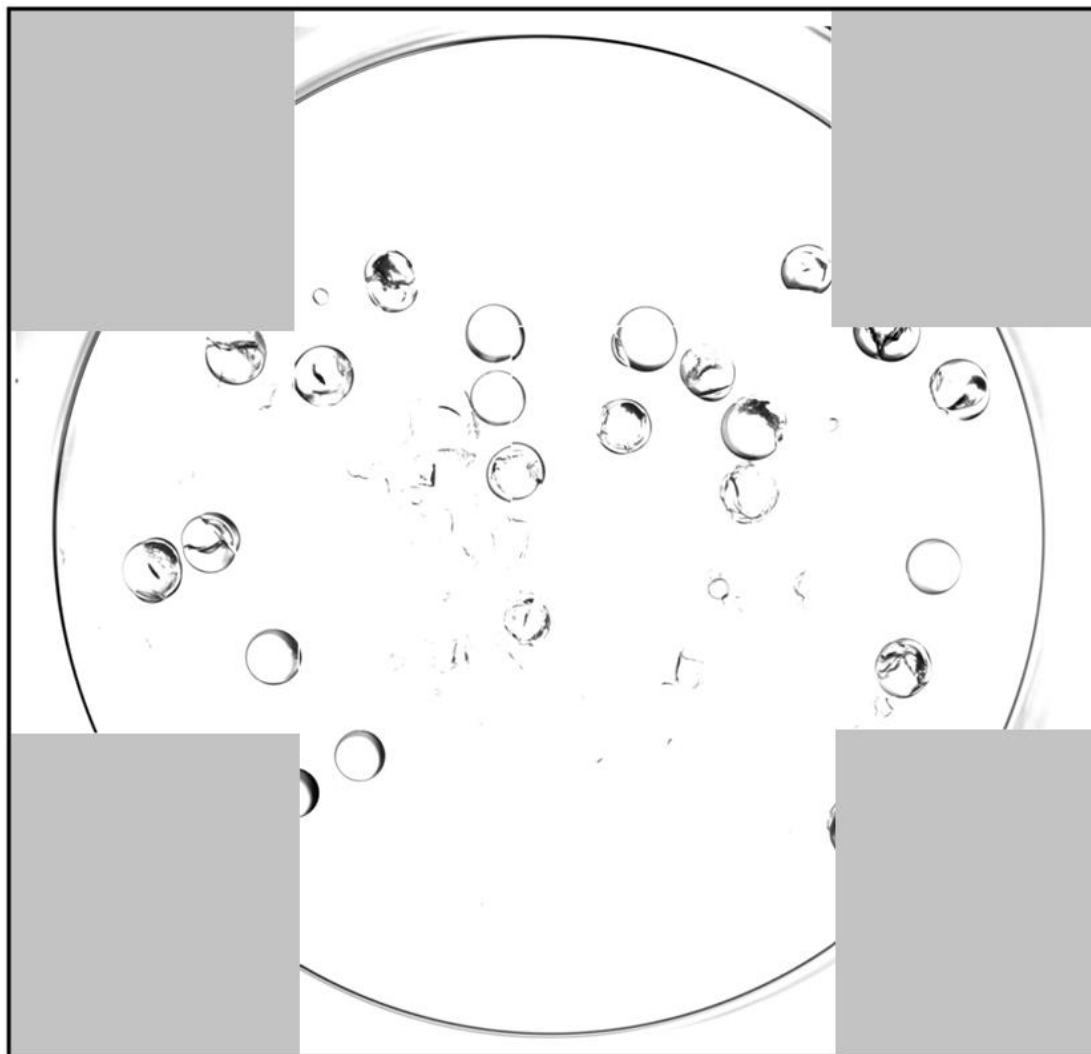


Abbildung 4.45: Hits der OBOC-Bibliothek inkubiert mit CXCL8-Biotin **4** und MPVA-Strep Magnetpartikeln **35**. Hellfeldbilder wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 5x Vergrößerung in einer 96-Well Mikrotiterplatte aufgenommen. Es wurden vier Aufnahmen an verschiedenen Positionen des Wells vorgenommen und das Bild im Anschluss zusammengesetzt. Außerhalb der abgebildeten Bereiche waren keine weiteren Partikel zu finden. Die Anzahl der Hits beträgt 22. Nicht dokumentierte Bereiche sind in grau unterlegt.

Bei 20x Vergrößerung unter dem Mikroskop wurde die Ablösung der verwendeten Magnetpartikel von den einzelnen Partikeln durch den denaturierenden Puffer kontrolliert. Dabei wurde beobachtet, dass der Großteil der Partikel vollständig von Magnetpartikeln befreit werden konnte, aber bei einigen Partikeln selbst nach Wiederholung des Separationsprotokolls keine Veränderung der Beladung mit Magnetpartikeln zu beobachten war (Abbildung 4.46).

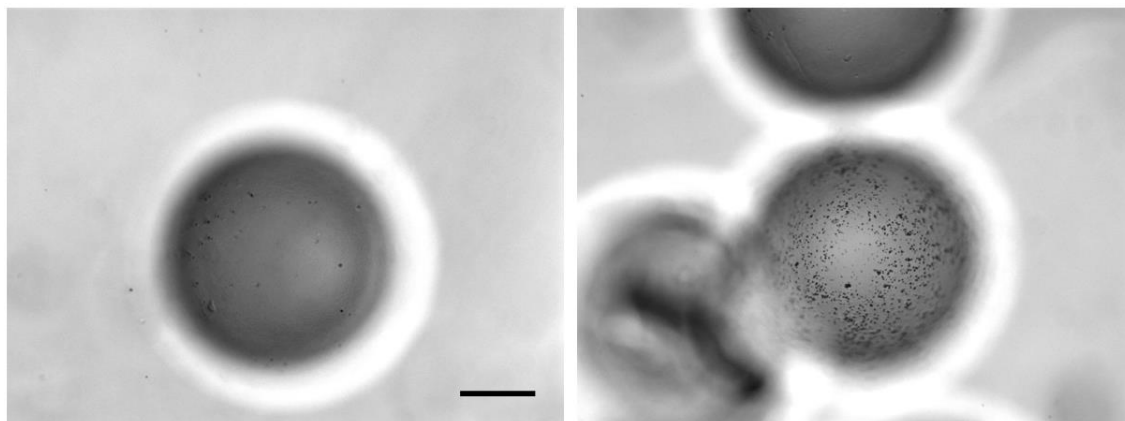


Abbildung 4.46: Hits der OBOC-Bibliothek inkubiert mit CXCL8-Biotin **4** und MPVA-Strep Magnetpartikeln **35**. Es wurde zweimal mit Reduktionspuffer behandelt, um Syntheseharz und Magnetpartikel voneinander zu trennen. Hellfeldbilder wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 20x Vergrößerung in einer 96-Well Mikrotiterplatte aufgenommen. Links: Partikel, von dem die MPVA-Strep Partikel durch Reduktion getrennt werden konnten, rechts: ein Partikel, der noch Magnetpartikel auf seiner Oberfläche trägt. Skala: 100  $\mu\text{m}$ .

Das persistente Anhaften der funktionalisierten Magnetpartikel an den am Syntheseharz gebundenen Liganden erschwert eine anschließende Sequenzierung der bindenden Moleküle. Da diese für die Sequenzierung vom Syntheseharz abgespalten werden müssen, ist es möglich, dass stark bindende Liganden weiterhin im Komplex mit CXCL8 bleiben und somit nicht in die zu untersuchende Lösung übergehen. Weiterhin können CXCL8 und abgelöstes Streptavidin Artefakte bei der massenspektrometrischen Sequenzierung hervorrufen oder auch durch Ionenunterdrückung Fragmente der Liganden gänzlich im Untergrundrauschen untergehen lassen. Die Optimierung der Partikelseparation, Spaltung der Makrozyklen und Sequenzierung durch MALDI-MS/MS sowie partiellen Edman-Abbau waren Gegenstand nachfolgender Arbeiten.<sup>26</sup>

<sup>26</sup> Nachfolgende Arbeiten durchgeführt in einer Master Thesis von Pascal Wiegand und von Julia Susanne Wack im AK Schmitz (TU Darmstadt)

---

#### 4.4. Zyklische Peptide als CXCL8 Liganden

---

Im Gegensatz zu Peptiden werden Peptide nicht von Proteasen abgebaut und besitzen so potentiell eine höhere Halbwertszeit in klinischen Anwendungen. Um Peptide zu synthetisieren, die gute Bindungseigenschaften zu Chemokinen aufweisen, wurden in dieser Arbeit zwei Strategien angewandt. Zum einen muss die Löslichkeit der aus der Synthese resultierenden Peptide in Betracht gezogen werden. Diese ist bei peptidischen Liganden in wässrigen, gepufferten Medien von großer Bedeutung, da für diagnostische Anwendungen mit Biomolekülen möglichst physiologische Bedingungen reproduziert werden müssen. Besonders hydrophobe Peptidsequenzen eignen sich daher nicht als Liganden für diagnostische Zwecke oder potenzielle Inhibitoren *in vivo*. Es besteht die Möglichkeit, durch geeignete Wahl der Peptidbausteine die Seitenketten von bekannten peptidischen Liganden der Biomoleküle nachzuahmen. Diese Vorgehensweise hat einerseits den Vorteil, dass die Eigenschaften löslicher Peptidsequenzen direkt auf Peptide übertragen werden und damit unter physiologischen Bedingungen lösliche Peptide resultieren. Andererseits können Wechselwirkungen der Peptidseitenketten, die eine wichtige Rolle in der Peptid:Protein-Affinität spielen, direkt auf das äquivalente Peptid kopiert werden. Eine OBOC-Bibliothek pentamerer Peptide, deren Seitenketten denen bekannter Peptidliganden für CXCL8 nachempfunden wurden, wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit von Julia Wack synthetisiert und gescreent.<sup>[397]</sup> Eine andere Strategie ist die Fixierung der Struktur bekannter peptidischer Bindungspartner. Durch Erhöhung der Rigidität von Peptiden könnten deren Affinität gegenüber ihren Bindungspartnern erhöht werden, da entropische Verluste bei der Komplexbildung reduziert werden. Natürlich vorkommende bioaktive Peptide weisen häufig makrozyklische Elemente auf, die diesen eine gewisse Rigidität und damit höhere Affinität, sowie verbesserte Stabilität gegenüber Proteolyse verleihen. Die Zyklisierung linearer Peptide ist daher seit vielen Jahren eine etablierte Methode.<sup>[357, 403-417]</sup>

Wie auch bei Peptiden sind verschiedene synthetische Routen zur Zyklisierung von Peptiden möglich. So kann Zyklisierung durch Verknüpfung reaktiver Peptid-Termini (head-to-tail)<sup>[418-420]</sup>, Seitenketten (side-chain-to-side-chain)<sup>[421-423]</sup> oder einer Kombination aus beidem (side-chain-to-tail)<sup>[424-425]</sup> zugänglich gemacht werden.<sup>[356]</sup> Da Peptide resistent gegen proteolytischen Abbau sind, beschränken sich diese Strategien lediglich auf die Erhöhung der Rigidität des Peptidgerüsts und damit der Einschränkung konformativer Freiheitsgrade, was zu einer Verbesserung der molekulare Erkennung der Liganden führen kann.<sup>[418]</sup> Beispielsweise wirken unnatürliche peptidomimetische Analoga des *actin-interacting-protein 1* (AIC-1) als Antagonisten gegen den AgrC-Transmembran-Rezeptor und beeinflussen so das *quorum sensing* von Bakterien.<sup>[426]</sup> Durch die Zugänglichkeit neuer peptidomimetischer Substanzen durch Zyklisierung, besteht ein steigendes Interesse an der Erschließung für biomedizinische Anwendungen dieser Substanzen, beispielsweise als Ligand für Protein-Zielmoleküle.<sup>[427-428]</sup>

Es wurden in dieser Arbeit daher bekannte Peptid-Hexamer-Sequenzen mit Affinität zu CXCL8, die aus einer linearen OBOC-Bibliothek stammen, zyklisiert.<sup>[1, 3]</sup> Außerdem wurde eine zyklische Peptid-Pentamer-OBOC-Bibliothek synthetisiert, deren Bausteine den Sequenzen bekannter peptidischer Liganden nachempfunden, aber randomisiert sind. Abbildung 4.47 zeigt die beiden Strategien in einer Übersicht zusammengefasst.

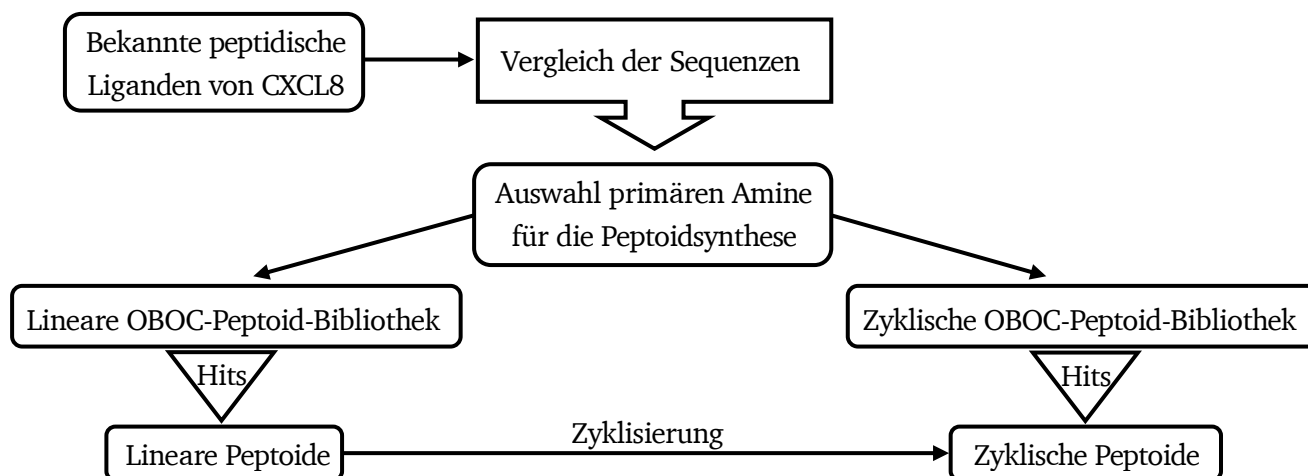


Abbildung 4.47: Strategie zur Entwicklung bioaktiver cyclischer Peptide. Die Sequenzen bekannter peptidischer Liganden für das Zielmolekül werden verglichen und häufig vorkommende bzw. für die Affinität wichtige Aminosäuren werden ausgewählt. Äquivalente primäre Amine werden für die Synthese von linearen und cyclischen OBOC-Peptoid-Bibliotheken verwendet. Hits der cyclischen Bibliothek und evaluierte Hits der linearen Bibliothek als zyklische Peptide nachsynthetisiert.

#### 4.4.1. Peptoid Synthese und Analyse

Peptide wurden nach der Submonomermethode von Zuckermann *et al.* synthetisiert.<sup>[271]</sup> Es wurden nur primäre Amine für die Synthese verwendet, die peptidischen Seitenketten entsprechen oder diese um eine Methylen-Gruppe verlängert nachahmen. Alle verwendeten Harze und primären Amine wurden im Arbeitskreis bereits in der Peptidsynthese eingesetzt und weisen hohe Umsetzungsraten bei der Verwendung mit Brom- und Chloressigsäure auf. Peptide für Experimente auf Oberflächen wurden auf Tentagel MB HMBA Harz durchgeführt, da der HMBA-Linker bei den sauren Abspaltbedingungen für die Seitenkettenschutzgruppen stabil ist und die synthetisierten Sequenzen somit auf der Harzoberfläche bleiben. Damit kann eine spätere Abspaltung unter orthogonalen Bedingungen zur Sequenzierung der Peptide gewährleistet werden. Die verwendeten primären Amine wurden einerseits nach ihrer kommerziellen und synthetischen Zugänglichkeit, sowie nach dem Vorkommen der entsprechenden Aminosäuren in den bekannten CXCL8-bindenden Peptiden IL8RPLoopsE 6 und CXCR1-p1 15 ausgewählt. Dabei wurde lediglich auf den analogen Glutaminsäure-Baustein und Prolin verzichtet. Die ausgewählten primären Amine sind kostengünstig kommerziell erhältlich und kommen gänzlich ohne N-terminale Schutzgruppen aus, was gegenüber der Peptidsynthese eine einfachere und kostengünstigere Synthesestrategie zulässt. Alle in dieser Arbeit verwendeten primären Amine, inklusive der Seitenkettenschutzgruppen und der hier verwendeten Nomenklatur sind in Abbildung 4.48 dargestellt.

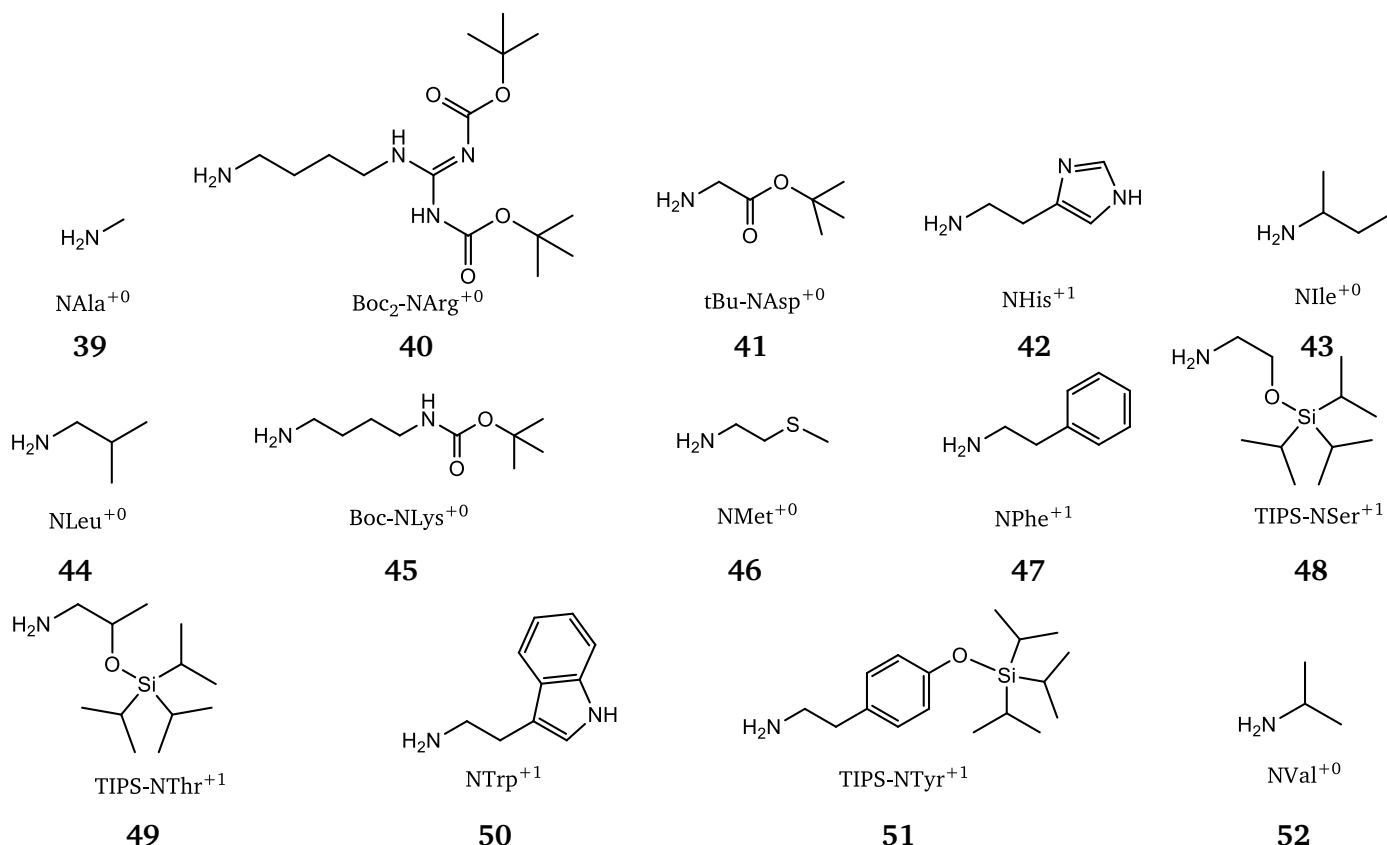
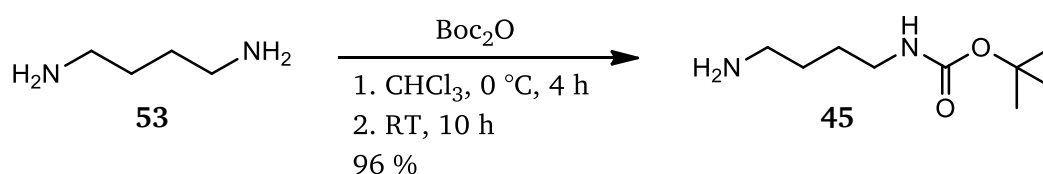
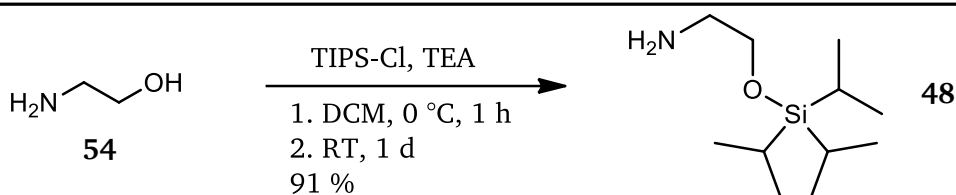


Abbildung 4.48: Primäre Amine, die für die Peptoidsynthese in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Bezeichnung der jeweiligen Peptoidbausteine ist den Aminen zugeordnet. Bei Verwendung von ungeschützten Aminen für NHis<sup>+1</sup> und NTrp<sup>+1</sup> musste der Acylierungsschritt in der Submonomersynthese mit Chloressigsäure durchgeführt werden, um Substitutionen an der Seitenkette zu verhindern.<sup>[2]</sup> Die Nomenklatur der peptoidischen Bausteine wurden vom Dreibuchstabencode der äquivalenten Aminosäuren abgeleitet und wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten von Culf *et al.* eingeführt.<sup>[5]</sup> Die hochgestellte Zahl gibt an, um wie viele CH<sub>2</sub>-Inkrementen die Seitenkette des Peptoidbausteins im Vergleich zur Aminosäure verlängert ist.

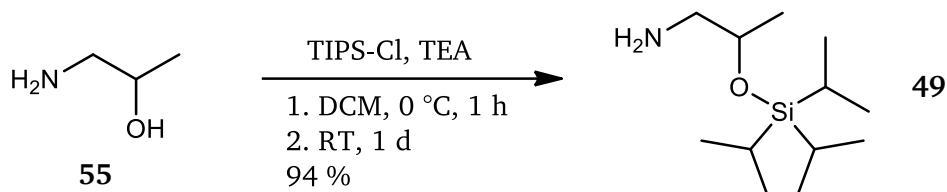
Die ungeschützten primären Amine und tBu-NAsp<sup>+0</sup> **41** sind kostengünstig kommerziell erhältlich. 1,4-Diaminobutan **53** wurde nach West *et al.* auf einer Seite Boc-geschützt, um die primäre Aminvorstufe für Boc-NLys<sup>+0</sup> **45** (96% Ausbeute) zu erhalten (Schema 4.3).<sup>[429]</sup> Die TIPS-Schutzgruppen für Ethanolamin **54**, 1-Aminopropan-2-ol **55** und Tyramin **56** wurden nach Zuckermann *et al.*, Birch *et al.* und Holstein *et al.* angebracht, um die primären Aminvorstufen für TIPS-NSer<sup>+1</sup> **48** (91% Ausbeute), TIPS-NThr<sup>+1</sup> **49** und TIPS-NTyr<sup>+1</sup> **51** (83% Ausbeute) zu erhalten (Schema 4.4 bis Schema 4.6).<sup>[276, 430-431]</sup> Boc<sub>2</sub>-NArg<sup>+0</sup> **40** (84% Ausbeute) wurde nach einer Vorschrift von Hickey *et al.* (Schema 4.7) und NMet<sup>+0</sup> **46** (78% Ausbeute) nach Fushimi *et al.* (Schema 4.8) synthetisiert.<sup>[432-433]</sup>



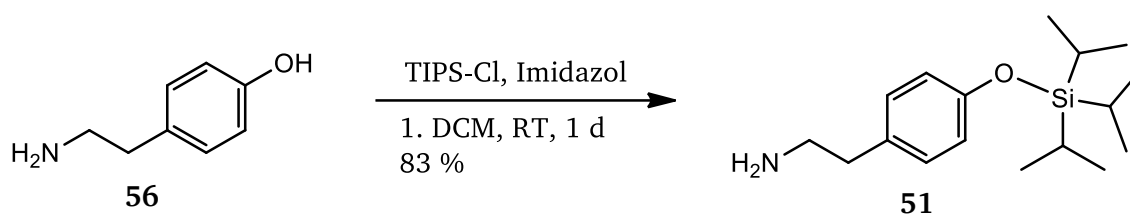
Schema 4.3: Selektive Schützung eines primären Amins von 1,4-Diaminobutan **53** mit Boc<sub>2</sub>O. Primäres Amin für Boc-NLys<sup>+0</sup>.



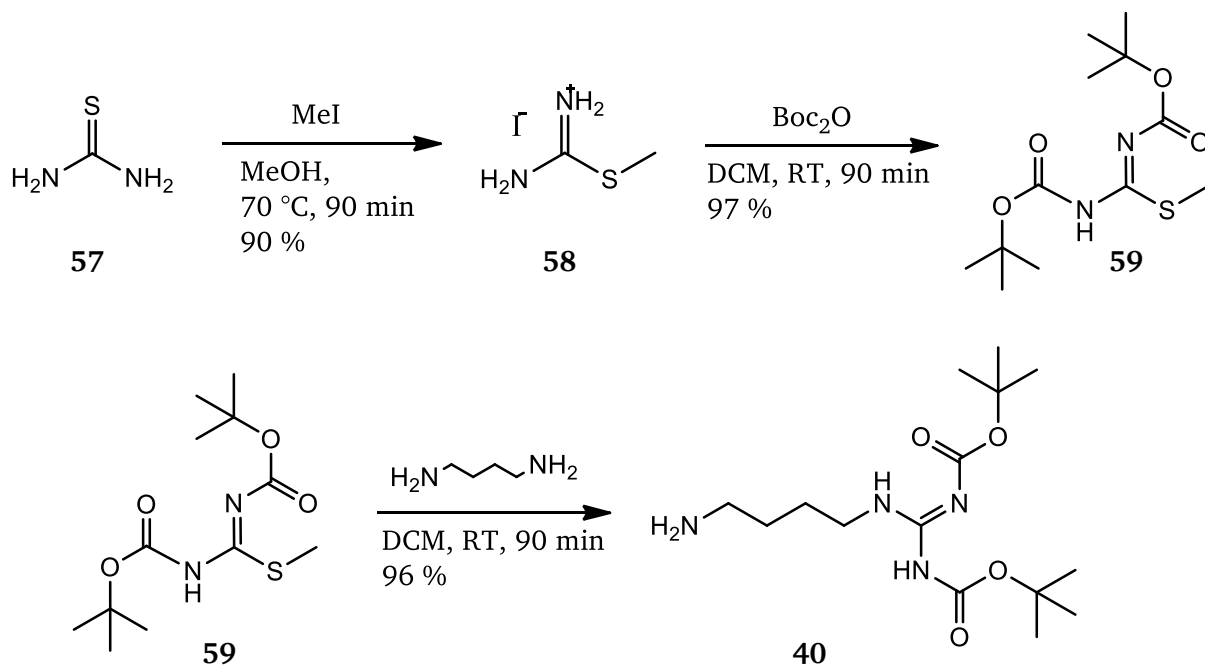
Schema 4.4: Schützung von Ethanolamin **54** mit Triisopropylsilylchlorid (TIPS-Cl).  
Primäres Amin für TIPS-NSer<sup>+</sup>1.



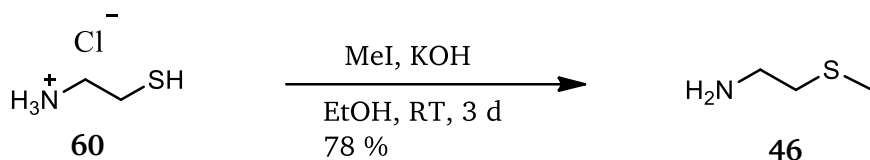
Schema 4.5: Schützung von racemischem 1-Aminopropan-2-ol **55** mit TIPS-Cl.  
Primäres Amin für TIPS-NThr<sup>+</sup>1.



Schema 4.6: Schützung von Tyramin **56** mit TIPS-Cl. Primäres Amin für TIPS-NTyr<sup>+</sup>1.



Schema 4.7: Dreistufensynthese der primären Aminvorstufe von Boc<sub>2</sub>-NArg<sup>+</sup> **40**. Thioharnstoff **57** wird durch Methyliodid methyliert, um Methylisothioharnstoff **58** zu erhalten, der durch Schützung mit Boc<sub>2</sub>O zu Boc<sub>2</sub>-Methylisothioharnstoff **59** umgesetzt wird. Durch Substitution mit 1,4-Diaminobutan **53** wird das primäre Amin für Boc<sub>2</sub>-NArg<sup>+</sup> **40** erhalten.



Schema 4.8: Synthese der primären Aminvorstufe von NMet<sup>+0</sup> **46** durch Methylierung von Cysteamin Hydrochlorid **60** mit Methyljodid.

Für die in dieser Arbeit durchgeführte Peptoid-Submonomersynthese wurde eine Reaktionszeit von einer Stunde für den Acylierungsschritt gewählt. Die Reaktionszeit der darauf folgenden Aminierung variierte jedoch abhängig davon, welche Acylierungsreagenz verwendet wurde. Für Peptoidsequenzen die weder NTrp<sup>+1</sup> noch NHis<sup>+1</sup> beinhalten wurde Bromessigsäure gewählt, da diese bereits nach 1,5 h eine vollständige Substitution des Halogens durch die primären Amine zeigte. Der Reaktionsverlauf wurde qualitativ durch den Chloraniltest verfolgt, der sensitiv auf die Anwesenheit primärer und sekundärer Amine reagiert.<sup>[277-279]</sup> Dabei werden Amine auf Harzpartikeln kolorimetrisch durch eine starke blaue Färbung nachgewiesen, die innerhalb von ein bis zwei Minuten Reaktionszeit der Reagenz auf die Partikel auftritt. Bei Peptoidsequenzen, die heterozyklische Amine beinhalten wurde die Acylierung mit Chloressigsäure durchgeführt, da diese zu Nebenreaktionen bei der Substitution von Bromessigsäure neigen. Die Reaktionszeit der Aminierung musste wegen der geringeren Reaktivität des Chlors bei Substitutionen mit Aminen auf 3 h erhöht. Dafür konnte auf die Verwendung von Schutzgruppen an den Heterocyclen verzichtet werden.<sup>[2]</sup> Als Lösemittel wurde N-Methylpyrrolidon (NMP) im Substitutionsschritt eingesetzt, um Nebenreaktionen zu vermeiden, die durch den Zerfall von DMF zu Methylamin entstehen können. NArg<sup>+0</sup> musste aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in NMP und DMF in Dichlormethan gelöst werden. Bei Verwendung von Hydrochloriden wie NHis<sup>+1</sup> und NAsp<sup>+0</sup> wurde das Amin in einem 1:1 (v:v) Gemisch von Dimethylsulfoxid (DMSO) und Diisopropylethylamin (DIPEA) gelöst, um die freie Base zu generieren, und direkt eingesetzt. Im Gegensatz zur Peptidsynthese ist bei der Peptoid-Submonomersynthese keine N-terminale Fmoc-Schutzgruppe erforderlich. Dadurch ist die Bestimmung der Harzbeladung nicht direkt durch Abspalten und spektroskopische Quantifizierung des Dibenzofulvens möglich. Die Zyklisierung der Peptoide am Harz setzt einen C-terminalen bivalenten Linker voraus, der den Ringschluss von N-Terminus und C-Terminus ermöglicht (analog zur terminalen Peptidzyklisierung). Durch die Wahl von Fmoc-hCys(Trt)-OH oder Fmoc-Lys(Mtt)-OH konnte eine Quantifizierung der Harzbeladung durch die Fmoc-Entschützung dieses Linkerbausteins stattfinden. Die Abspaltung der Peptoide von säurelabilem Harz und gleichzeitigem Entschützen der Seitenketten, wurde mit einer Mischung aus 88 % TFA, 2.5 % Triisopropylsilan (TIPS), 2.5 % Anisol, 2 % H<sub>2</sub>O und 5% Dithiothreitol (DTT) für 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. TIPS und Anisol fangen dabei die freiwerdenden reaktiven Spezies aus den Schutzgruppen ab (z.B. ter-Butyl-Kationen), damit diese nicht für Nebenreaktionen (z.B. Alkylierung von Thiolen) zur Verfügung stehen, während DTT das Peptoid vor ungewünschter Oxidation schützt. Unter diesen Bedingungen ist auch das basenlabile TentaGel-HMBA Harz, das für die Synthese der OBOC-Bibliotheken verwendet wurde, stabil und lediglich die Seitenketten werden entschützt.



#### 4.4.2. Affinität von CXCL-8 bindenden Peptoiden nach Zyklisierung

In einer vorrangegangenen Arbeit in Kooperation mit Dr. Dorothea Helmer wurde eine Peptoid-Hexamer-OBOC-Bibliothek auf TentaGel-HMBA Macrobeads synthetisiert und nach der in Kapitel 4.3.1 validierten Methode gescreent.<sup>[1, 3]<sup>27</sup></sup> Nach Analyse und Auswertung der Hits per MALDI TOF MS/MS wurden 29 Sequenzen ausgewählt, auf TentaGel-HMBA Macrobeads nachsynthetisiert und einem zweiten Screening unterzogen. Es wurde festgestellt, dass NTrp<sup>+1</sup> Seitenketten in den Peptoidsequenzen durch die hohe Autofluoreszenz im FITC-Kanal zu falsch positiven Ergebnissen bei dieser Screeningmethode führen können (vgl. Kapitel 4.3). Diese Sequenzen, sowie Sequenzen mit ausschließlich hydrophoben Seitenketten, für die eine geringe Löslichkeit zu erwarten war, wurden im Rescreen verworfen und es resultierten 18 positiv validierte Hits für eine Interaktion mit CXCL8. Jede dieser 18 Sequenzen wurden auf 2-Chlorotriylchlorid-Harz nachsynthetisiert, wobei jedes Peptoid am N-Terminus mit 5(6)-Carboxyfluorescein markiert wurde. Die Bindungsaffinitäten der gereinigten Peptide wurden durch Fluoreszenzanisotropie-Experimente in Puffer C bestimmt und bewegten sich im Bereich zwischen etwa 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ . Auffällig ist dabei, dass die Sequenzen zum großen Teil NLys<sup>+0</sup> Seitenketten enthalten, welche für eine hohe positive Nettoladung bei physiologischem pH sorgt. Da auf der Oberfläche von CXCL8 keine isolierten negativ geladenen Bereiche auftreten (Abbildung 4.49) und dieses mit einem pI von 9.0 selbst beim verwendeten pH-Wert von 7,4 ein kationisches Protein ist, können somit unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen beim Screening und den Bindungsstudien ausgeschlossen werden.<sup>[434]</sup> Die Sequenzen der fluoreszenzmarkierten Peptide und deren Bindungskonstanten sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Die Zelltoxizität und biologische Aktivität der Peptide wurde an neutrophilen Granulozyten und durch Aktin-Polymerisationsassay und Transwellassay bestimmt.<sup>28[3]</sup>

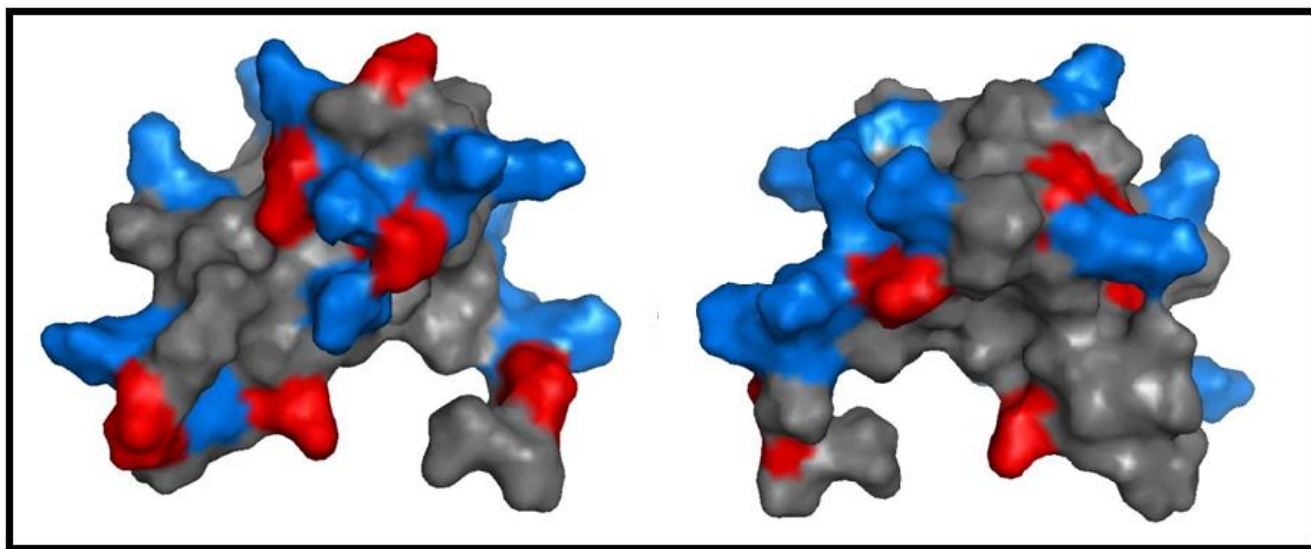


Abbildung 4.49: CXCL8 Monomer (pdb ID 5D14, N-terminales Ser1 und Ala2 nicht in Sequenz enthalten) aus Röntgenstrukturanalysen (Brzezinski et al. – unpubliziert). Saure Reste (Glu, Asp) sind rot, basische Reste (Arg, Lys, His) blau hervorgehoben.

<sup>27</sup> Synthese, Screening und Bindungsstudien durchgeführt von Dorothea Helmer [damals TU Darmstadt, heute Karlsruhe Institute of Technology.] Methodenvalidierung, Reinigung aller Peptide per HPLC und Charakterisierung durch ESI-MS durchgeführt von Kevin Brahm, TU Darmstadt

<sup>28</sup> Durchgeführt von Ina Rink, AK Schmitz, TU Darmstadt

Tabelle 4.6: Sequenzen und  $K_d$ -Werte der fluoreszenzmarkierten Hits aus dem 2-Kanalfluoreszenzscreening einer Peptoid-Hexamer-OBOC-Bibliothek.<sup>[1, 3]</sup> Sequenzen sind mit dem C-Terminus links dargestellt. Die Standardabweichung der Bindungskonstanten wurde aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

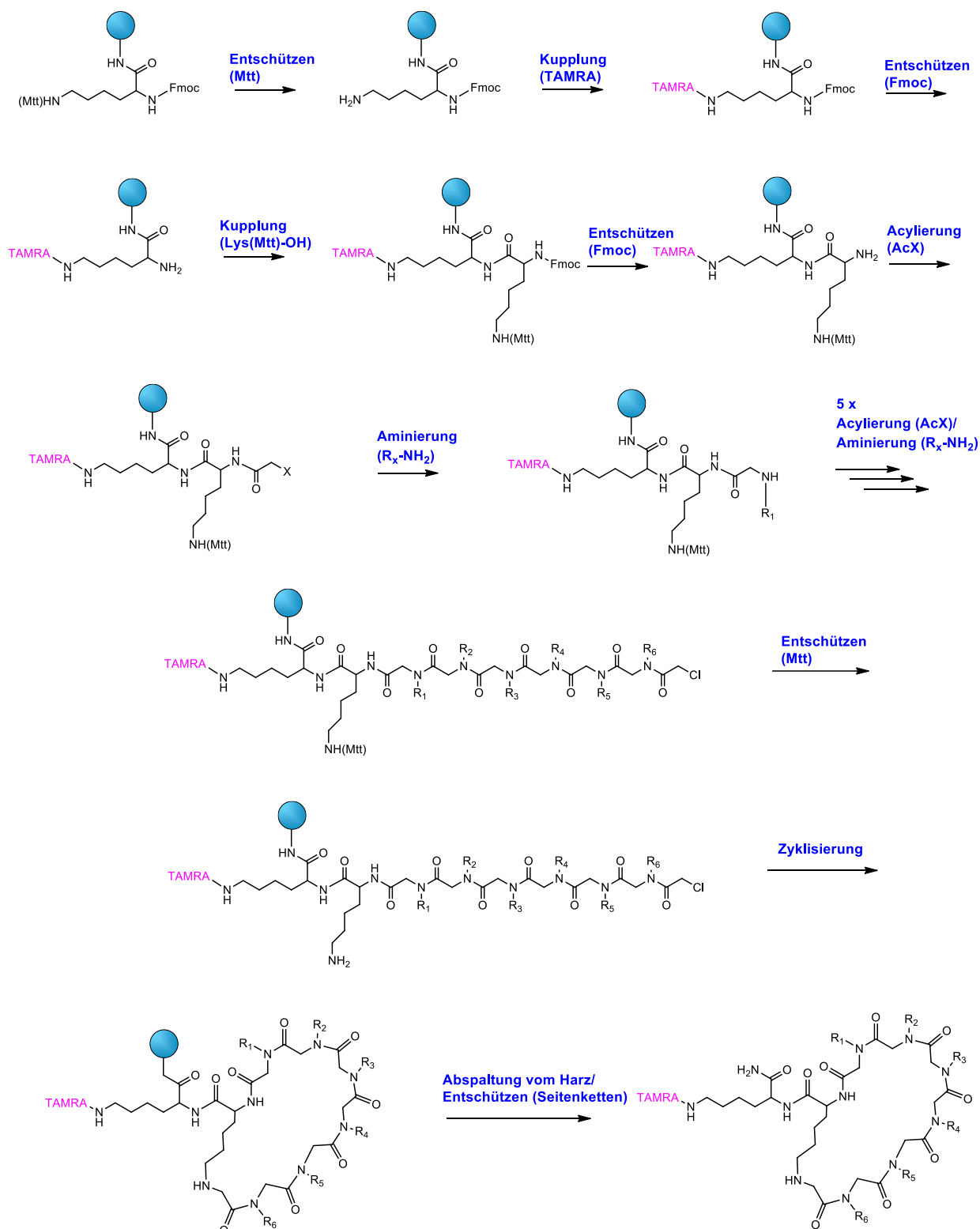
Hit Nummer	Sequenz	$K_d \pm \text{STABW } [\mu\text{M}]$
1	HO- NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	11.6 $\pm$ 1.8
2	HO- NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NAsp <sup>+</sup> -Fluo	20.0 $\pm$ 2.9
3	HO- NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NSer <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	42.9 $\pm$ 9.2
4	HO- NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	65.3 $\pm$ 1.3
5	HO- NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	41.4 $\pm$ 17.6
6	HO- NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	57.2 $\pm$ 19.7
7	HO- NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NAsp <sup>+</sup> -Fluo	19.0 $\pm$ 2.4
8	HO- NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	16.7 $\pm$ 4.8
9	HO- NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NAsp <sup>+</sup> -Fluo	25.0 $\pm$ 7.4
10	HO- NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NAsp <sup>+</sup> -Fluo	43.3 $\pm$ 5.1
11	HO- NLeu <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	47.6 $\pm$ 12.8
12	HO- NLeu <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NAsp <sup>+</sup> -Fluo	112.3 $\pm$ 36.1
13	HO- NLeu <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NAsp <sup>+</sup> -Fluo	71.4 $\pm$ 35.3
14	HO- NVal <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	51.1 $\pm$ 15.4
15	HO- NPhe <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	39.8 $\pm$ 13.9
16	HO- NPhe <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NAsp <sup>+</sup> -Fluo	35.4 $\pm$ 10.9
17	HO- NPhe <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NSer <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> NVal <sup>+</sup> NLeu <sup>+</sup> -Fluo	21.4 $\pm$ 6.1
18	HO- NPhe <sup>+</sup> NTrp <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NTrp <sup>+</sup> NPhe <sup>+</sup> NLys <sup>+</sup> -Fluo	27.6 $\pm$ 6.4

Ein Vergleich der Sequenzen der linearen an CXCL8 bindenden Peptoide zeigt einen hohen Anteil des basischen Rests NLys<sup>+</sup> in den Positionen 2-6, wobei in jeder Sequenz etwa 2-4 dieser Reste enthalten sind und mit den hydrophoben Resten NVal<sup>+</sup>, NPhe<sup>+</sup> und NLeu<sup>+</sup> alternieren. Ein Muster bestehend aus dem sauren Rest NAsp<sup>+</sup> gefolgt von 1-2 hydrophoben Resten und einem basischen NLys<sup>+</sup>, das die Ladungsverteilung im ELR Motif im N-Terminus von CXCL8 nachahmt lässt sich in den Sequenzen 2, 7, 9, 12, 13 und 16 finden und ist möglicherweise in der Bindung mit dieser Region involviert. Allerdings wird dieses Motif sowohl bei stark als auch schwach bindenden Peptoiden gefunden und ein N-terminales NLeu<sup>+</sup> tritt ebenfalls bei Peptoiden mit ähnlicher Affinität auf. Alle Sequenzen weisen in N-terminaler Position entweder NLeu<sup>+</sup> oder den sauren Rest NAsp<sup>+</sup> auf. NPhe<sup>+</sup> tritt präferiert in Position 2 auf, wobei in Positionen 2, 3 und 4 vorwiegend NLys<sup>+</sup>, ein hydrophober Rest und ein weiteres NLys<sup>+</sup> oder hydrophober Rest zu finden ist. Position 5 wird in 14 der 17 Sequenzen von NLys<sup>+</sup> eingenommen. Eine vereinheitlichte Sequenz der bindenden Peptoide kann also als NAsp<sup>+</sup>/NLeu<sup>+</sup>(NLys<sup>+</sup>/Nhp<sup>b</sup>)<sub>3</sub>NLys<sup>+</sup>/NLeu<sup>+</sup>NLys<sup>+</sup>/Nhp<sup>b</sup> wobei Nhp<sup>b</sup> analog für hydrophobe Reste eingesetzt wird.

---

Diese Peptoide wurden als zyklische Varianten resynthetisiert. Da diese Peptoide nicht sequenziert werden mussten, wurde für die Zyklisierung eine kovalente Verknüpfung des Peptoid-N-Terminus mit einer flexiblen C-terminalen Seitenkette gewählt. Für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten der zyklischen Peptoide durch Fluoreszenzanisotropie mussten diese fluoreszenzmarkiert werden. Das normale Vorgehen dafür sieht vor, dass der N-Terminus des Peptoids mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wird, bevor das Peptoid vom Harz abgespalten wird. Da der N-Terminus der Peptoide für die Zyklisierung verwendet wird und dann nicht mehr zugänglich ist, musste eine selektive Markierung einer Seitenkette durchgeführt werden. Dazu wurde ein C-terminales Fmoc-Lys(Mtt)-OH nach einer modifizierten Strategie von Brocket *et al.* in die Sequenz eingeführt.<sup>[435]</sup> Dieses wurde vor der Fmoc-Abspaltung selektiv mit 1 % TFA entschützt und fluoreszenzmarkiert. In einer ähnlichen Strategie publiziert durch die Lim Gruppe, wurde 5(6)-Carboxyfluorescein an ein C-terminales Lysin, das durch die Alloc-Gruppe geschützt war verknüpft.<sup>[424]</sup> In dieser Herangehensweise wurde ein Pd-Katalysator zum Entschützen der Alloc-Gruppe genutzt. Die Verwendung der Mtt-Schutzgruppe hat im Gegensatz dazu aber den Vorteil, dass diese unter mild sauren Bedingungen mit verdünnter TFA abgespalten werden kann, was wesentlich kosteneffizienter ist. Da Fluorescein durch seine freien Hydroxylgruppen zu Nebenreaktionen in der Peptid- und Peptoidsynthese neigt, wurde für die Markierung 5(6)Carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA) **24** nach Kvach *et al.* synthetisiert und verwendet.<sup>[435-436]</sup> TAMRA ( $\lambda_{\text{ex}}=546$ ,  $\lambda_{\text{em}}=579$ ) trägt anstelle der Hydroxylgruppen tertiäre Aminsubstituenten, sodass die Nebenreaktionen nicht mehr auftreten, die bei Fluorescein vorkommen.<sup>[437]</sup> Es ist im Vergleich zu Fluorescein wesentlich photostabiler, bleicht also langsamer aus und besitzt pH-unabhängige Anregungs- und Emissionsmaxima. Nach Entschützung und Markierung des ersten Lysins der Sequenz wird ein weiteres Lys(Mtt)-OH in die Sequenz eingeführt, dessen Seitenkette nach Synthese der Peptoidsequenz selektiv entschützt und für die Zyklisierung mit dem N-Terminus verwendet wird.

Da die synthetisierten zyklischen Substanzen sowohl Peptid, als auch Peptoidbausteine enthalten, kann man diese als zyklische Peptomere bezeichnen.<sup>[253]</sup> Die allgemeine Strategie zur Synthese und Zyklisierung dieser Peptomere ist in Schema 4.9 dargestellt.



Schema 4.9: Nach selektivem Entschützen der Seitenkette des C-terminalen Lys(Mtt)-OH mit 1% TFA/2.5% TIPS in DCM folgt Markierung mit TAMRA nach Standard SPPS-Protokoll (3 äq TAMRA, 3 äq HBTU, 6 äq. DIPEA) in DMF. Der N-Terminus wird mit 20% Piperidin entschützt, ein weiteres Lys(Mtt)-OH wird gekuppelt und der N-Terminus wird wieder entschützt. Es folgt die Synthese der Peptoidsequenz durch Acylierung mit Bromessigsäure oder Chloressigsäure (10 äq. AcX, 9 äq. DIC in DMF) und Aminierung mit dem der Position entsprechendem primären Amin (20 äq. R<sub>x</sub>NH<sub>2</sub> in NMP, DCM oder DMSO). Der N-Terminus wird anschließend mit Chloressigsäure (AcCl) acyliert, das Lys(Mtt) an Position 2 selektiv entschützt und Zyklisierung durch Ringschluss des N-Terminus mit der freien Lysin-Seitenkette in 2M DIPEA in DMF durchgeführt. Das zyklisierte Peptomer wird mit 88% TFA/5% DTT/2% H<sub>2</sub>O/2.5% TIPS/2.5% Anisol) vom Harz gespalten.

Der Erfolg der Zyklisierung auf dem Harz wurde durch einen negativen Chloraniltest bestätigt. Die Rohpeptomere wurden nach der Abspaltung durch semipräparative HPLC analysiert und gereinigt. Die Identifizierung des Peptomers erfolgte durch Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie. Wie in Abbildung 4.50 exemplarisch an Peptomer **78** (cyclo-18) zu erkennen ist, konnten die Peptomere **61-78** (cyclo-1 bis cyclo-18) bereits in guter Reinheit bis zu ca. 70 % synthetisiert werden. Die Schulter des Hauptpeaks resultiert daraus, dass das zum Markieren eingesetzte TAMRA **24** als Isomerengemisch eingesetzt wurde, welche bei der HPLC aufgetrennt werden. Da die TAMRA-Markierung bei der ESI nicht stabil ist und sich vom Molekül abspalten kann, wurden bei der anschließenden Massenspektrometrie zum größten Teil nur die Massen der Molekülpeaks ohne TAMRA erhalten (vgl. Abbildung 4.52). Das Signal tauchte dabei häufig als Basissignal im negativen Modus auf. Dieser Effekt wurde bei der als Standard verwendeten Ionisations-Methode in fast jeder Messung reproduziert.

mAU

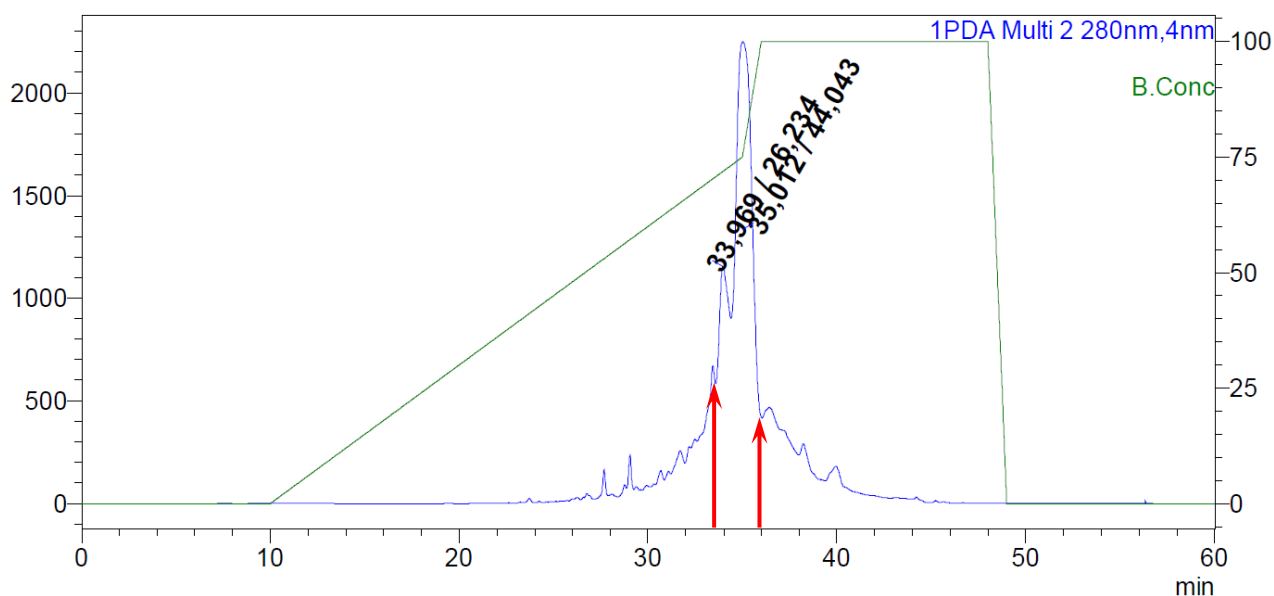


Abbildung 4.50: Exemplarisches RP18-HPLC Chromatogramm von Peptomer **78** (cyclo-18) Rohprodukt. Die grüne Linie zeigt die Konzentration von Eluent B an, die zunächst über 1 CV konstant auf 0 % gehalten wird und dann über 3 CV auf 75 % stetig ansteigt. Im Anschluss wird die Säule mit 100% Eluent B für 1 CV gespült und auf 0% Eluent B zurückgesetzt. In blau ist die Absorption bei 280 nm gezeigt. Die Produktpeaks der beiden Isomere sind bei Retentionszeiten von 34-35 min zu sehen. Gesammelte Fraktion (rote Pfeile).

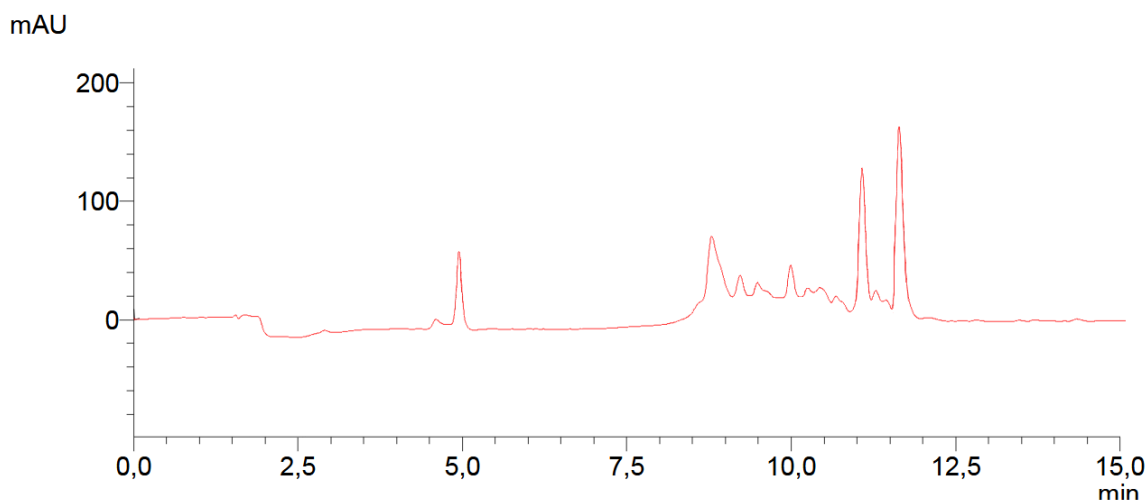


Abbildung 4.51: UV-Spur eines exemplarischen Chromatogramms von Peptomer **66** (cyclo-6) in der LC-MS-Analyse. Die Absorption ist bei 214 nm gezeigt (rot). Die Peaks mit der entsprechenden Produktmasse sind hervorgehoben (rote Pfeile).

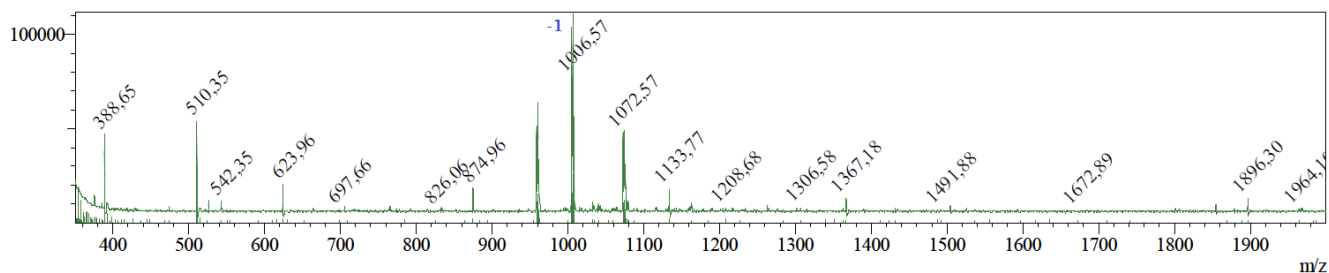


Abbildung 4.52: Exemplarisches ESI-MS Massenspektrum von Peptomer **66** (cyclo-6). Der Molekülpeak  $[M-1H-TAMRA]^-$  ist im negativen Modus gut zu erkennen, da TAMRA bei der Ionisierung abgespalten wird.

Die Fluoreszenzanisotropie der Peptomere wurde am Tecan M1000 Plattenleser gemessen. Wie auch schon nach der Zyklisierung der CXCL8-RPLoops Bindepeptide für CXCL8 (vgl. Kapitel 4.2.2) ist hier zu beobachten, dass die Bindungsisothermen umgekehrt verlaufen und der Fluorophor offenbar bei der Bindung des Peptomers an CXCL8 an Beweglichkeit gewinnt. Dieser Effekt ist bei den Peptomeren **68** (cyclo-8) und **78** (cyclo-18) am ausgeprägtesten mit einer Anisotropiedifferenz von 70 mAU zwischen freiem und gebundenem Peptomer (Abbildung 8.20 und Abbildung 8.30). Diese Peptomere sind die einzigen Sequenzen mit aromatischen Seitenketten an Position 3 und 5 und scheinen die optimale Voraussetzung zur Bindung des Fluorophors durch  $\pi$ -Stacking einzunehmen. Beim Vergleich der Bindungskonstanten der Peptoide vor und nach Zyklisierung, kann man bei fast allen Sequenzen eine deutliche Verbesserung der Affinität erkennen (Tabelle 4.7). Die Bindungskonstanten lagen nach der Zyklisierung im Bereich von etwa  $1 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$  und damit etwa eine Größenordnung niedriger als die der linearen Sequenzen. Lediglich für die Peptomere **73** (cyclo-13) und **77** (cyclo-17) war nach Zyklisierung keine Affinität zu CXCL8 mehr messbar. Es ist möglich, dass bei diesen Varianten der Fluorophor weniger stark mit der Peptomersequenz wechselwirkt und sich so die Fluoreszenz-Anisotropie der gebundenen und ungebundenen Form kaum voneinander unterscheidet.

Peptomer **72** (cyclo-12) und **78** (cyclo-18) zeigten die höchste Affinität zu CXCL8, wobei Peptomer **72** (cyclo-12) nach Zyklisierung mit einem Faktor von 112.3 die größte Affinitätserhöhung zeigt.

Cyclo-18 **78** wurde aber lediglich als Kontrolle synthetisiert, da in der vorangegangenen Arbeit eine sehr geringe Löslichkeit festgestellt wurde und es somit nicht den Kriterien entspricht, die für die Auswahl dieser Peptide festgelegt wurde. Die geringe Löslichkeit wurde in diesen Experimenten bestätigt.

Tabelle 4.7: Vergleich der Bindungskonstanten der linearen Peptide mit den entsprechenden zyklisierten Sequenzen.

Hit Nummer (linear)	Peptomer Nummer (zyklisiert)	$K_d \pm \text{STABW } [\mu\text{M}]$ (lineares Peptoid)	$K_d \pm \text{STABW } [\mu\text{M}]$ (zyklisiertes Peptomer)	Faktor
1	<b>61</b> (cyclo-1)	$11.6 \pm 1.8$	$3.7 \pm 0.9$	3.1
2	<b>62</b> (cyclo-2)	$20.0 \pm 2.9$	$7.3 \pm 5.1$	2.7
3	<b>63</b> (cyclo-3)	$42.9 \pm 9.2$	$3.4 \pm 0.7$	12.6
4	<b>64</b> (cyclo-4)	$65.3 \pm 1.3$	$1.7 \pm 0.2$	38.4
5	<b>65</b> (cyclo-5)	$41.4 \pm 17.6$	$3.1 \pm 2.1$	13.4
6	<b>66</b> (cyclo-6)	$57.2 \pm 19.7$	$2.2 \pm 10.5$	26.0
7	<b>67</b> (cyclo-7)	$19.0 \pm 2.4$	$3.1 \pm 4.8$	6.1
8	<b>68</b> (cyclo-8)	$16.7 \pm 4.8$	$4.0 \pm 1.4$	4.2
9	<b>69</b> (cyclo-9)	$25.0 \pm 7.4$	$2.4 \pm 0.3$	10.4
10	<b>70</b> (cyclo-10)	$43.3 \pm 5.1$	$2.0 \pm 0.3$	21.7
11	<b>71</b> (cyclo-11)	$47.6 \pm 12.8$	$2.7 \pm 0.4$	17.6
12	<b>72</b> (cyclo-12)	$112.3 \pm 36.1$	$1.0 \pm 0.3$	112.3
13	<b>73</b> (cyclo-13)	$71.4 \pm 35.3$	n.b.	n.b.
14	<b>74</b> (cyclo-14)	$51.1 \pm 15.4$	n.b.	n.b.
15	<b>75</b> (cyclo-15)	$39.8 \pm 13.9$	$2.5 \pm 0.6$	15.9
16	<b>76</b> (cyclo-16)	$35.4 \pm 10.9$	$1.9 \pm 0.3$	18.6
17	<b>77</b> (cyclo-17)	$21.4 \pm 6.1$	n.b.	n.b.
18	<b>78</b> (cyclo-18)	$27.6 \pm 6.4$	$0.9 \pm 0.2$	30.7



---

## 5 Fazit und Ausblick

---

### 5.1. Rationales Design von CXCL8 bindenden Peptidomimetika

---

Auf Zelloberflächen lokalisierte Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung und bei Protein-Protein Interaktionen, die im Zusammenhang mit Prozessen in der Krankheitsentstehung stehen, und sind damit eine der am meisten untersuchten Molekülklassen in der Entwicklung neuer Therapeutika. Stukturbasiertes Design von Rezeptor-imitierenden Molekülen ist eine gängige und vielversprechende Strategie nicht nur für die Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen, sondern auch für die Entwicklung und Weiterentwicklung von peptidischen und peptidmimetischen Liganden als Inhibitoren ihrer korrespondierenden Zielproteine. Durch Lokalisierung entsprechender Bindungsstellen in Rezeptorsequenzen für das Zielprotein, können chemische und strukturelle Eigenschaften dieser Regionen in kleineren und stabileren Molekülen nachgebildet werden, die die nativen Interaktionen zu ihren Bindungspartnern beibehalten. Werden die sekundären Strukturelemente aus der native Struktur vom Liganden nachgebildet und die funktionellen Gruppen entsprechend im Raum vororientiert, ist die Affinität größer<sup>[360]</sup> Im Design neuer Liganden ist es daher eine gängige Methode, interagierende Sequenzen in ihrer Konformation zu beschränken, indem man diese auf ein Gerüst aufbringt, das die native Struktur der Sequenz stabilisiert. So wurde beispielsweise von Drakopopoulou *et al.* ein CD4 nachbildendes Peptid, CD4M, auf einem Gerüst von Skorpion Toxin stabilisiert, um dessen Affinität zu gp120 um zwei Größenordnungen zu steigern.<sup>[438]</sup> Datta *et al.* immobilisierten CCR3 Sequenzen auf einem kleinen, löslichen Proteingerüst. Die Bindungsaffinitäten dieses Rezeptoranalogs CROSS<sup>5</sup> zu verschiedenen Mutanten des Chemokins Eotaxin korrelieren mit denen von CCR3 und weisen daher auf den Gebrauch gleicher Interaktionsstellen hin.<sup>[439]</sup> Barter *et al.* nutzten das CROSS Protein als Gerüst für den N-Terminus und ECD4 von CXCR1 und konnte eine Wechselwirkung der ECD4 mit CXCL8 nur in Kombination mit Wechselwirkungen des N-Terminus nachweisen.<sup>[79]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von Liganden abgeleitet aus der Sequenz des Rezeptors CXCR1 stark von deren Struktur in Lösung abhängt. Die im CD-Spektrum erkennbare  $\alpha$ -helikale Struktur des aus CXCR1 abgeleiteten Loops-Peptids legte nahe, dass diese zu einer Vororganisation der Seitenketten führte und damit für dessen höhere Affinität verantwortlich war. Durch Substitution von einzelnen Aminosäuren, die nicht direkt an der Peptid-Protein Wechselwirkung beteiligt sind aber die Ausbildung sekundärer Strukturen begünstigen, konnte in dieser Arbeit eine deutliche Destabilisierung der sekundären Strukturelemente des CXCL8-bindenden Peptids IL8RPLoops gezeigt werden. Auch die Bindungsaffinität dieses Liganden zu CXCL8 nahm durch die Einführung helixbrechender Elemente deutlich ab. Im Gegensatz dazu wurde die Affinität der von Attwood *et al.* beschriebenen unstrukturierten Variante des site I CXCL8 Bindepeptids CXCR1-p1<sup>[224]</sup>, durch Einführung helixbrechender Elemente eine geringe Abschwächung ihrer Bindungsaffinität MD Simulationen der beiden Mutanten IL8RPLoopsQ und IL8RPLoopsE untermauern die Vermutung der helikalen Stabilisierung und höheren Rigidität von IL8RPLoopsE und geben Hinweise auf eine nicht-kovalente Zyklisierung dieser höher affinen Variante. Ähnliche Beobachtungen wurden von Meier *et al.* an CD4 nachbildenden Peptiden, die an gp120 binden, berichtet. Nach kovalenter Stabilisierung der Schleifenstruktur der CD4 Bindungsstelle durch Disulfidbrücken-vermittelte head-to-tail Zyklisierung konnte eine einzelne Aminosäure durch experimentelle und MD simulierte Daten auf Peptidebene nachgewiesen werden, die als Konformationsstabilisator und somit als essentieller Rest für die gp120 Bindung dient.<sup>[440]</sup>

---

Die Makrozyklisierung ist ein weiterer Ansatz, um die Rigidität von Peptiden und damit ihre Affinität zu erhöhen.<sup>[357, 441]</sup> Beim Design der zyklischen Varianten von IL8RPLoopsQ und IL8RPLoopsE musste ein Fluorophor in den Makrozyklus eingebracht werden, da Fluoreszenzanisotropie zum Messen der Bindungskonstanten verwendet wurde. In dieser Arbeit wurde dies durch orthogonales Entschützen eines Lysin-Rests als erste Aminosäure der Sequenz und Markierung mit TAMRA, statt Fluorescein um Nebenreaktionen bei der Synthese der restlichen Sequenz auszuschließen. Nach Vorbild von Chandra *et al.* wurde die Makrozyklisierung durch einen weiteren N-terminale Lysin-Rest und C-terminales Succinimid vermittelt.<sup>[358]</sup>

MD Simulationen dieser durch kovalent *side-chain-to-tail* zyklisierten Varianten von IL8RPLoopsQ und IL8RPLoopsE zeigen eine weit eingeschränkere Konformation beider Peptide, die unabhängig von sekundären Strukturen in Experimenten auf höhere Bindungsaffinitäten hinweisen. Durch Makrozyklisierung konnte auch die Resistenz der Peptide gegenüber Trypsinabbau stellvertretend für den Abbau durch andere Proteasen erhöht werden. Das Einfügen eines rigideren Linkers zwischen den beiden Peptidhälften oder einer zusätzlichen kovalenten Bindung zum Bilden eines Bizyklus könnte die Affinität zu CXCL8 noch weiter erhöhen und sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden. In ersten Chemotaxis-Assays konnte eine Aktivität der Makrozyklen als CXCL8-Inhibitoren bereits nachgewiesen werden, was das Verfolgen dieser Strategie vielversprechend macht.

Die beobachtete hohe Fluoreszenzanisotropie der markierten zyklischen Peptide ist ein literaturbekannter Effekt. Er wird häufig als Aggregationseffekt beschrieben, weshalb in diesen Fällen für gewöhnlich ein anderer Fluorophor gewählt wird, der ein „normales“ Verhalten des entsprechenden Peptids aufzeigt. Eine Verdünnungsreihe mit TAMRA-markierten zyklischen Peptiden zeigte keine Abnahme der Anisotropie bei Abnahme der Konzentration, wie es für reversible Aggregatbildung zu erwarten wäre<sup>[338]</sup>. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass die TAMRA-Markierung mit dem Peptid selbst interagiert und zu einer Vororganisation der Konformation führt. Bei Bindung von CXCL8 wird TAMRA verdrängt, was zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität aufgrund der Änderung der chemischen Umgebung und einer Abnahme der Fluoreszenzanisotropie aufgrund höherer Beweglichkeit führt. Dieser Effekt spielt möglicherweise eine Rolle in vielen Experimenten in denen TAMRA als Marker für Peptide und Proteine verwendet wird, die mit anderen Biomolekülen oder Zellen wechselwirken. Die positive Ladung gekoppelt mit dem hydrophoben aromatischen System in diesem Farbstoff könnte für dieses Verhalten förderlich sein, das im Gegensatz dazu beim negativ geladenen Fluorescein weniger ausgeprägt ist. Im Bereich der Biosensorik werden sogenannte Quenchbodies beschrieben, in denen TAMRA an einen Nanobody konjugiert ist und bei Bindung an das Antigen aus der Bindung an den Nanobody verdrängt wird. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität wird als Messgröße verwendet.<sup>[361]</sup> Die Abnahme der Fluoreszenzanisotropie diente den Autoren als Beleg für den Verdrängungsmechanismus.<sup>[363]</sup> Die hier vorgestellten markierten Peptide könnten also zu Biosensoren weiterentwickelt werden. Allerdings ist ihre Affinität noch zu gering, um CXCL8 in physiologischen Konzentrationen nachweisen zu können. Die Wechselwirkungen verschiedener Fluorophore mit makrozyklischen Peptiden und Peptoiden und deren Einfluss auf die Affinität sollte in weiteren Arbeiten näher untersucht werden.

Zusammengefasst konnte durch strukturelle Simulationen von Bereichen des Chemokinrezeptors CXCR1 kombiniert mit empirischen strukturellen Voraussagen und experimentellen Daten aus CD-Spektroskopie und Bindungsassays die Bedeutung der Helix-Ausbildung im *site II* CXCL8 Bindungspeptid IL8RPLoops 5 gezeigt werden. Basierend darauf wurde die zyklisierte Variante IL8RPCycloopsQ 25 entwickelt, die im Vergleich zu ihrem Vorgänger von dessen Sekundärstrukturen unabhängige verbesserte biochemische Eigenschaften aufweist. Folgende Untersuchungen von IL8RPLoopsE konnten den helikalen

---

Charakter des Peptids nicht bestätigen, sodass die nicht-kovalente Zyklisierung hier eine größere Rolle spielen könnte. Da CXCL8 in nativer Form dimerisiert würde sich anbieten die Bindungseigenschaften der hier vorgestellten linearen und cyclischen Varianten der IL8RPLoops-Peptide mit nicht-dimerisierenden<sup>[442]</sup> und kovalent-dimeren Varianten<sup>[65]</sup> von CXCL8 zu untersuchen und zu vergleichen. Dies würde zeigen welchen Einfluss das Monomer-Dimer-Gleichgewicht die Bindungsaffinität der Peptide hat und ob insbesondere die linearen Peptide vorwiegend an eine der beiden Varianten binden. Außerdem sollten Untersuchungen an CXCL8 Varianten ohne ELR Motiv angestellt werden, da dieses bereits für die Rezeptoraktivierung als wichtige Region bestätigt wurde<sup>[69-70, 443]</sup> und als Interaktionsstelle mit der *site II* im zwei-Regionen Bindungsmechanismus gilt<sup>[76-78, 339-340]</sup>, aber die Interaktion mit den hier vorgestellten Liganden als *site II* Mimetika noch bestätigt werden muss.

---

## 5.2. Screening von Substanzbibliotheken

---

Die Synthese von Substanzbibliotheken ist eine effiziente Methode, viele verschiedene potenzielle Liganden für bestimmte Zielmoleküle zu generieren. Die Mix-and-Split Methode, mit deren Hilfe große auf Synthescharz immobilisierte OBOC-Bibliotheken generiert werden können, wurde bereits 1991 von Lam *et al* beschrieben und für eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle eingesetzt.<sup>[304, 383, 444]</sup> Die ersten Peptoid-Bibliotheken wurden durch ein ähnliches stochastisches Partikelverteilungsverfahren von Zuckermann *et al.* hergestellt, wobei in einem iterativen Prozess 18 individuelle Pools nach Spaltung vom Synthescharz in Lösung, statt eines Pools direkt auf der Festphase gescreent wurden und Sub-Bibliotheken synthetisiert und gescreent werden mussten.<sup>[276, 302]</sup> Seitdem wurden besonders von Kodadek *et al.* zahlreiche Peptoid-OBOC Bibliotheken synthetisiert und untersucht.<sup>[305, 389, 445]</sup> Für die Submonomermethode zur Synthese dieser Peptoid-Bibliotheken finden nur primäre Amine Anwendung, die hohe Kupplungseffizienz aufweisen.<sup>[5]</sup> Bindungspartner für Proteine können einfach durch Inkubation mit markierten Varianten des Zielproteins identifiziert werden. Zu diesem Zwecke werden Synthescharze eingesetzt, deren Quelleigenschaften es möglich machen, diese sowohl unter organischen Bedingungen zur Synthese, als auch unter wässrigen Bedingungen zum Screening zu verwenden. Für das Screening mit fluoreszenzbasierten Verfahren wurden die hierfür eingesetzten hydrophilen, auf PEG basierten Tentakelpolymerpartikel eingehend auf ihre Autofluoreszenz in denen in der Mikroskopie gängigen FITC und RHO Kanälen analysiert.<sup>[445]</sup>

Um die durch Autofluoreszenz entstehenden Nachteile in der Sensitivität und Reproduzierbarkeit von fluoreszenzbasierten Verfahren auszugleichen, wurden später Quantum-Dots als Proteinmarkierungen eingeführt.<sup>[389]</sup> Diese sind im Vergleich bis zu 20-mal heller und resistenter gegen Photobleaching als organische Fluorophore.<sup>[446]</sup> Screening Methoden basieren dabei häufig auf nicht- oder semi-automatisierter mikroskopischer Untersuchung, die den Nachteil langer Belichtung der Partikel und damit die Gefahr des Photobleaching der verwendeten Fluoreszenzmarkierung birgt, oder auf der schnelleren, vollautomatischen COPAS Partikelsortier-Technologie.<sup>[391]</sup> Da die Autofluoreszenz von Partikeln einer OBOC-Bibliothek nicht nur von der Art der verwendeten Partikel abhängt, sondern auch von der Sequenz der synthetisierten Liganden, können stark fluoreszierende Partikel einer Bibliothek nicht einfach vorsortiert werden.<sup>[257, 428]</sup> Methoden autofluoreszierende Partikel zu sortieren basieren entweder auf konfokalem *nano-scanning* (CONA), bei dem das Innere jedes Partikels gescannt wird und positive Partikel lediglich durch die Fluoreszenz an der Partikeloberfläche identifiziert und aussortiert werden, oder auf einem Vergleich der Fluoreszenz im FITC und RHO Kanal bei der COPAS Sortierung. Beide Methoden wurden von Hintersteiner

---

*et al.* beschrieben.<sup>[447]</sup> Beide müssen mit kostspieligen und spezialisierten Apparaturen durchgeführt werden, was eine Strategie basierend auf Fluoreszenzmikroskopie, die für viele Labore eine bereits verfügbare Technologie ist, zu einer interessanten Herangehensweise macht.

Die in dieser Arbeit angewandte semi-automatisierte fluoreszenzmikroskopische Methode<sup>[1]</sup> nimmt sich die von Hintersteiner *et al.* eingeführte Strategie zum Vorbild, durch die Verwendung mehrerer Fluoreszenzkanäle unspezifische Fluoreszenz auszuschließen. Durch Wahl von literaturbekannten Kontrollpeptiden mit unterschiedlicher Affinität zu Streptavidin<sup>[394-396, 448]</sup> wurde überprüft, ob die Fluoreszenzintensität beim Screening eine Aussage über die Bindungsaffinität des partikelgebundenen Liganden zulässt. Dies war durch Aviditätseffekte bei kleineren Liganden und eine Schwellenkonzentration ab der keine Bindung mehr detektierbar ist nicht der Fall.

Mithilfe zweier Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Nettoladungen bei dem in den Experimenten verwendeten pH-Wert, konnten sekundäre elektrostatische Wechselwirkungen mit den Kontrollpeptiden ausgeschlossen werden. Das vorgestellte Screeningverfahren ist einfach auf weitere Zielmoleküle übertragbar und kann Liganden, die im geringen mikromolaren Bereich binden, kostengünstig und mit verhältnismäßig wenig technischem Aufwand identifizieren. Wegen des großen Einflusses, den Aviditätseffekte auf das vorgestellte Verfahren haben, ist dieses auf Bibliotheken mit Liganden kurzer Sequenzen anwendbar.

Das Screening von Substanzbibliotheken mit funktionalisierten Magnetpartikeln hat im Gegensatz zum fluoreszenzbasierten Screening den Vorteil, dass eine Identifizierung positiver Bindungspartner und die Separation von den negativen Substanzen in einem Schritt durchgeführt werden kann. Die Separation von Proteinen oder Zellen durch Antikörper-beschichtete Magnetpartikel ist bereits ein in der Routine eingesetztes Werkzeug und entsprechend funktionalisierte Partikel sind beispielsweise vom Unternehmen Miltenyi-Biotech<sup>29</sup> oder BioLegend<sup>30</sup> kommerziell erhältlich. Eine Methode Peptid -und Peptoid-OBOD-Bibliotheken auf TentaGel-Partikeln magnetpartikelbasiert zu screenen wurde von Astle *et al.* vorgestellt. Dabei wurde zunächst die Bibliothek mit einem anti-FLAG Antikörper inkubiert und anschließend durch Sekundärantikörper-modifizierte Magnetpartikel sortiert.<sup>[251]</sup> In einer Herangehensweise von Hu *et al.* wurden mit Streptavidin(Strep) beschichtete Magnetpartikel dazu eingesetzt eine Bibliothek von Peptiden, die als Substrat für Transglutaminase dienen können, zu screenen.<sup>[250]</sup> Dazu wurde die Bibliothek mit Transglutaminase und einem Biotin-ähnlichen Substrat, Desbiotin, inkubiert. Die resultierenden desbiotinylierten Substrate wurden mittels Strep-Magnetpartikeln separiert. Der Funktionalisierungsgrad wurde anschließend durch fluoreszenzmarkiertes Streptavidin bestimmt und als Maß für die Eignung des Peptids als Enzymsubstrat herangezogen.

In dieser Arbeit wurden die verwendeten Magnetpartikel ebenfalls mit Streptavidin beschichtet, um biotinylierte Zielmoleküle durch Inkubation einfach an den Magnetpartikeln immobilisieren zu können. Im Gegensatz zur direkten kovalenten Verknüpfung der Partikel mit dem Zielmolekül hat diese Strategie den Vorteil, dass ein Vorrat der Partikel für alle Kontrollexperimente verwendet werden kann und zusätzliche Fehlerquellen durch unterschiedliche Kupplungseffizienzen von fluoreszentem Farbstoff und Zielprotein ausgeschlossen werden. Außerdem konnten die mit Streptavidin beschichteten Partikel direkt für Mobilisierungsversuche mit den an Streptavidin bindenden auf TentaGel-Partikeln immobilisierten Peptiden eingesetzt werden. Weitere Vorteile ergeben sich daraus, dass Streptavidin potenziell vier Bindungsstellen pro Molekül für Biotin aufweist und so eine erhöhte Beladung der Streptavidin-Partikel gegenüber direkt

---

<sup>29</sup> miltenyibiotec.com (Zugriff 09.12.2019)

<sup>30</sup> biolegend.com (Zugriff 09.12.2019)

---

funktionalisierten möglich wird. Außerdem kann eine Funktionalisierung nach Beschichtung mit Streptavidin ohne Zuhilfenahme von Kupplungsreagenzien, durch Inkubation mit biotinyliertem Zielmolekül in einem Schritt erfolgen, was diese Partikel zu einem sehr variablen und gut reproduzierbaren Werkzeug macht. Aus diesen Gründen sind Strep-Magnetpartikel auch bereits kommerziell für verschiedene Anwendungen erhältlich, beispielsweise hat das Unternehmen Phenomenex 2019 diese unter dem Namen bioZen MagBeads 2019 zur Aufbereitung von Proben in der Bio-LC eingeführt.<sup>31</sup> Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Mobilisierung der wesentlich größeren TentaGel Syntheseharzpartikel durch Wechselwirkungen immobilisierter Streptavidin-bindender Peptide mit dem Streptavidin auf der Magnetpartikeloberfläche möglich ist. Durch Immobilisierung von biotinyliertem CXCL8 auf den Magnetpartikeln konnte erfolgreich eine mit CXCR1 transfizierte Zelllinie aus Kulturmedium gebunden, sowie neutrophile Granulozyten aus Vollblut isoliert werden und damit gezeigt werden, dass Bindungspartner für CXCL8 erkannt und separiert werden können. Allerdings ist diese Strategie zur Zellisolierung nur bedingt geeignet, da eine Aggregation der Zellen beobachtet wurde und die entsprechenden Zellen durch Bindung des Rezeptors mit CXCL8 aktiviert werden, wodurch es zu Artefakten in Folgeexperimenten kommen würde.

Die Inkubation der Magnetpartikel mit einer OBOC-Bibliothek makrozyklisierter Pentapeptomere ergab eine Ausbeute von 22 Screening positiven Partikeln deren Auswertung Gegenstand nachfolgender Arbeiten war. Bei einer Sequenzierung von zyklischen Peptoiden durch MALDI-TOF MS/MS würde es zunächst lediglich zur Ringöffnung kommen, was nur ein Signal der Molekülmasse zur Folge hat.<sup>[400]</sup> Nach dem Vorbild von Lee *et al.* wurde in dieser Arbeit ein hCyst-Rest zur Zyklisierung verwendet, der eine Linearisierung der Liganden beim Abspalten vom Harz zulässt und damit eine anschließende massenspektrometrische Sequenzierung möglich macht.<sup>[400]</sup>

Da sekundäre Wechselwirkungen der carboxyfunktionalisierten Oberfläche der Magnetpartikel mit Zielproteinen oder Sequenzen der Substanzbibliotheken nicht ausgeschlossen werden konnten, sollten weitere Experimente mit verschiedenen Deaktivierungsstrategien durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden die aktivierten Carboxy-Funktionen mit Glycin abgeblockt, was wiederum freie Carboxy-Funktionen auf der Oberfläche der Magnetpartikel generiert. Es könnte stattdessen Ethanolamin zum Blockieren der Funktionen eingesetzt werden, wodurch die Oberfläche der Partikel allerdings an Hydrophobizität gewinnen würde und es möglicherweise zur Aggregation der Magnetpartikel kommt. Dies sollte in Kontrollen überprüft werden. Auch muss der Einfluss der Beladung der in der Bibliothek verwendeten Partikel getestet werden. Chen *et al.* konnten bereits zeigen, dass die Ligandenkonzentration einen Einfluss auf die Bindung schwach affiner Liganden hat, was vermutlich auf Aviditätseffekte zurückzuführen ist, wie in dieser Arbeit anhand des fluoreszenzbasierten Screeningverfahrens gezeigt werden konnte.<sup>[449]</sup>

Es besteht außerdem noch Optimierungsbedarf in Bezug auf das nach dem Screening durchzuführende Ablösen der Magnetpartikel von den Partikeln der Substanzbibliothek, um eine Sequenzierung ohne Artefakte zu ermöglichen. Dies war ebenfalls schon Bestandteil nachfolgender Arbeiten.<sup>[337]</sup> Abschließend sollte das Screening einer OBOC-Bibliothek durch Magnetpartikel- und fluoreszenzbasiertes Verfahren durchgeführt und diese miteinander verglichen werden angelehnt an Arbeiten von Mendes *et al.* in denen fluoreszenzbasierte Verfahren zur Bestätigung von positiven Liganden aus dem Magnetscreening einer OBOC-Bibliothek genutzt wurden.<sup>[259]</sup>

---

<sup>31</sup> phenomenex.com (Zugriff 08.12.2019)



---

### 5.3. Zyklische Peptomere als CXCL8 Inhibitoren

---

Peptoide sind Peptidomimetika, von denen erstmals in 1992 berichtet wurde und die, genau wie Peptide, unter Verwendung ähnlicher chemischer Werkzeuge auf einer festen Phase synthetisiert werden können.<sup>[270-271]</sup> In dieser Arbeit wurden 17 verschiedenen mit TAMRA markierte makrozyklische Peptomere, basierend auf bereits publizierten linearen CXCL8 bindenden hexameren Peptoiden synthetisiert<sup>[1]</sup>. Durch die Flexibilität von linearen Hexapeptoiden, können diese in verschiedene Konformationen annehmen, um an ein Zielmolekül zu binden. Um ihre Beweglichkeit einzuschränken aber die bindende Konformationen der Liganden noch zulassen zu können, ist ein flexibler Linker von Vorteil. In Arbeiten von Lim und Lee wurde ein Homocystein-Rest in die Sequenzen der Peptomere einer Bibliothek eingefügt, nach Synthese entschützt und mit einer N-terminalen Chloroacetyl-Gruppe die Zyklisierung realisiert.<sup>[400]</sup> In dieser Arbeit wurde für die Makrozyklisierung ein orthogonal mit der Mtt-Schutzgruppe geschützter C-terminaler Lysin-Rest in die Peptoidsequenz inkorporiert und nach Kupplung einer Chloressigsäure an den N-Terminus unter mild-sauren Bedingungen entschützt. In Arbeiten von Chandra *et al.* wurde die anschließende *side-chain-to-tail* Zyklisierung durch nukleophile Substitution unter stark sauren Bedingungen in einem Schritt mit der Abspaltung vom Harz durchgeführt.<sup>[358]</sup> Um Nebenreaktionen mit weiteren nukleophilen Seitenketten ausschließen zu können, wurde die Zyklisierung in dieser Arbeit in 1% TFA vor der Abspaltung vom Harz und dem Entschützen der restlichen Seitenketten der Sequenz durchgeführt.<sup>[425, 450]</sup> Da die Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wird, könnte es interessant sein zu untersuchen, ob Entschützen und Zyklisierung in einem Schritt verlaufen. Eine Fluoreszenzmarkierung wurde mit TAMRA an einer zweiten C-terminalen flexiblen Lysin-Seitenkette durchgeführt, da die Bindungsaffinität zu CXCL8 durch Fluoreszenzanisotropie bestimmt werden sollte. TAMRA wurde eingesetzt, da die Hydroxylgruppen von dem gewöhnlich verwendeten 5(6)-Carboxyfluorescein in der folgenden Synthese der Peptomere Nebenreaktionen eingegangen wären.<sup>[437, 451]</sup> Diese Markierung führte, wie bei den zyklisierten Varianten des IL8RPLoops Bindepeptids, zu einer invertierten Bindungsisotherme bei Messung der Fluoreszenzanisotropie. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf eine Verdrängung des Fluorophors beim Binden des Peptomers an sein Zielprotein hervorgerufen wird, wobei der Fluorophor im freien Zustand des Peptomers in dieses faltet und beim Binden an das Zielprotein von diesem verdrängt wird und so eine erhöhte Beweglichkeit des Fluorophors resultiert. Die Flexibilität des Lysin-Restes lässt genügend Bewegungsfreiheit für den Fluorophor zur Rotation und Translokation zu, sodass sich dieser in die Nähe des Makrozyklus begeben und durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit diesem interagieren kann. NMR- und Röntgenkristallographie-Studien zeigten für hexamere zyklische Peptoide, dass räumlich große Seitenketten für gewöhnlich entgegengesetzt zueinander oder weg vom Zentrum des Makrozyklus zeigen.<sup>[418, 452-454]</sup> Da die hier vorgestellten Peptomere durch die Fluoreszenzmarkierung strenggenommen Heptamere sind, ist ein alternierendes Muster der Seitenketten wie bei den Hexameren nicht möglich. Es wird angenommen, dass 3-4 in jeweils entgegengesetzte Richtungen orientiert sind, mit vermutlich zwei kleineren Resten auf der gleichen Seite oder einem hydrophileren Rest nach außen. Es könnten in folgenden Arbeiten NMR-Untersuchungen durchgeführt werden um diese Vermutungen aufzuklären.

In ihrer zyklisierten Form sollten die verschiedenen Peptomere also untereinander eine größere Ähnlichkeit in der räumlichen Verteilung ihrer Seitenketten aufweisen als ihre linearen Vorgänger. Folgeexperimente mit Fluorophor- und Peptomer-Konzentrationsreihen zeigten, dass die hohe Anisotropie im freien Zustand nicht auf unspezifische Bindung an der Wand der Mikrotiterplatte und auch nicht auf Aggregation zurückzuführen ist. Die Makrozyklisierung erhöhte die Bindungsaffinität der untersuchten Peptomere um mindestens einer Größenordnung, wodurch CXCL8 Bindungspartner mit  $K_D$ s von 1.0 bis 7.3  $\mu$ M generiert wurden. Dies liegt

---

in der gleichen Größenordnung wie die Bindungskonstanten und IC50-Werte bereits publizierter zyklischer Peptomere, die an Polo-like-Kinase, Skp2 und Streptavidin binden.<sup>[424, 455-456]</sup> Dabei konnten die Peptomere in 2 Gruppen in Abhängigkeit von ihrer Fluoreszenzanisotropie eingeordnet werden. Peptomere mit hoher Fluoreszenzanisotropie von 91-109 mAU im ungebundenen Plateau der Bindungskurve und Peptomere mit niedriger Anisotropie von 68-78 mAU. Da der Unterschied zum niedrigeren ungebundenen Plateau, das bei 28-61 mAU liegt bei drei Peptomeren zu niedrig war, konnte für diese keine Bindungskonstante bestimmt werden. Es konnte keine Korrelation der Sequenz mit dem Verhalten dieser Gruppen zyklischer Peptomere gefunden werden. Eine genaue Untersuchung der Anordnung der Seitenketten könnte hier möglicherweise die unterschiedlichen Werte der Fluoreszenzanisotropie bei hohen und niedrigen CXCL8-Konzentrationen und auch die insgesamt ähnlichen Bindungsaffinitäten erklären. In zukünftiger Arbeit sollte eine Bibliothek zyklischer Peptoides mit hohem Anteil und Variation basischer und hydrophober Reste nach der hier vereinheitlichten Sequenz  $\text{NAsp}^{+0}/\text{NLeu}^{+0}(\text{NLys}^{+0}/\text{Nhp})_3\text{NLys}^{+0}/\text{NLeu}^{+1}\text{NLys}^{+0}/\text{Nhp}$ <sup>[338]</sup> synthetisiert werden und könnte zu weiteren effizienteren CXCL8-Liganden führen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Varianten des CXCL8 bindenden Peptids IL8RPLoops<sup>[227]</sup> weisen zwar eine höhere Affinität zu CXCL8 auf, aber sind durch die Länge ihrer Sequenz und ihre Hydrophobizität mit größerem Syntheseaufwand verbunden und schwer löslich. Die zyklischen Peptomere sind schneller synthetisiert, weisen gute Löslichkeit auf und sind resistent gegen Hydrolyse durch Proteasen. Erste Experimente weisen darauf hin, dass 10 der zyklischen Peptomere CXCL8-induzierte Chemotaxis in Agarose-Spot Assays inhibieren.<sup>[338, 457]</sup> Diese müssen zunächst noch durch quantitative CXCL8 Aktivitätsassays bestätigt werden, weisen aber darauf hin, dass zyklische Peptomere eine Alternative zu den Derivaten vom des Rezeptor abgeleiteten IL8RPLoopsE darstellen können. Die synthetisierten makrozyklischen Peptomere sollten außerdem auf ihre Affinität zu anderen Chemokinen mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften wie pI oder Affinität zu den CXCL8-Rezeptoren CXCR1 oder CXCR2 getestet werden.



## 6 Material und Methoden

### 6.1. Chemikalien und Materialien

Alle Chemikalien und Materialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: AB SCIEX (Framingham, MA, USA), AppliChem GmbH (Darmstadt, DE), Carbolution (Saarbrücken, DE), Corning (Kaiserslautern, DE), Ditabis (Pforzheim, DE), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, A), Iris Biotech (Marktredwitz, DE), Macherey & Nagel (Dueren, DE), Merck (Darmstadt, DE), Merck Novabiochem (Darmstadt, DE), Orpegen (Heidelberg, DE), PL-Laboratories (Port Moody, CAN), Rapp Polymers (Tuebingen, DE), Roche (Grenzach-Whylen, DE), Roth (Karlsruhe, DE), TH Geyer (Renningen, DE), Sarstedt (Nümbrecht, DE), Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE), Tecan (Maennedorf, CH), VWR (Darmstadt, DE). Organische Lösemittel in HPLC Reinheit und für die Synthese von Peptiden und Peptoiden wurden von VWR bezogen. Alle anderen Lösemittel wurden von Roth, TH Geyer oder VWR bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Mit Schutzgruppen versehene und freie primäre Amine, sowie Schutzgruppenderivate wurden von Carbolution und Sigma Aldrich bezogen, Kupplungsreagenzien für die Peptidsynthese von Iris Biotech, TH Geyer, Carbolution und Orpegen. Chlorotriethylchlorid-Synthescharz wurde bei PL-Laboratories und TentaGel MB HMBA, sowie TentaGel S AC Synthescharz bei Rapp Polymere erworben.

#### 6.1.1. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und wässrigen Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit MilliQ-Wasser (Merck MilliQ System) angesetzt und die pH-Werte mit HCl und NaOH eingestellt. Die häufig verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Tabelle 6.1: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien.

Puffer Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer A; pH 7.4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM, NaCl 90 mM
Puffer B; pH 7.4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM, NaCl 1.5 M
Puffer C; pH 7.4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM, NaCl 35 mM
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS); pH 7.4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, NaCl 137 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 mM, KCl 2.7 mM
Lysis-Puffer	1 mM EDTA, 0,2 mg/mL Lysozym, 0,1 mg/mL DNase I, ¼ Proteaseinhibitortablette (cComplete™ Mini, Roche) in Puffer A
Kupplungspuffer; pH 5,0	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.01 M, NaCl 0.4 M
Waschpuffer; pH 7.5	Tris 0.01 M, NaCl 0.15 M
Blockpuffer; pH 8.0	Glycin 1 M

Tris-Puffer; pH 8.8	Tris 1.5 M
Tris-Puffer; pH 6.8	Tris 0.5 M
SDS-Lösung	Natriumdodecylsulfat 10 %
10x Laufpuffer	Tris 0.25 M, Glycin 1.93 M, Natriumdodecylsulfat 35 mM
2x Lämmli-Puffer	Glycerin 20 %, Bromphenolblau 0.1 %, Tris-Puffer pH 6.8 125 mM
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat 10 %
10% Trenngel	H <sub>2</sub> O 3.93 mL, Tris-Puffer (pH 8.8) 3 mL, SDS-Lösung 120 µL, 30% Acrylamid 3.99 mL, APS-Lösung 100 µL, TEMED 10 µL
5% Sammelgel	H <sub>2</sub> O 2.3 mL, Tris-Puffer (pH 6.8) 1 mL, SDS-Lösung 40 µL, 30% Acrylamid 670 µL, APS-Lösung 40 µL, TEMED 2.5 µL
Kolloidale Coomassie-Lösung	85 % Phosphorsäure 10 %, Ammoniumsulfat 10 %, Coomassie BB G250 0.12 %, Methanol 20 %
RPMI Medium	RPMI-1640-Medium (Sigma Aldrich), 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicilin, 100 µg/mL Streptomycin, 350 µg/mL G418 (Geneticin)
Eluent A	Acetonitril 5%, 0.1% TFA
Eluent A + NH <sub>3</sub>	Acetonitril 5%, 1% Ammoniak
Eluent B	Acetonitril 95%, 0.1% TFA
Eluent B + NH <sub>3</sub>	Acetonitril 95%, 1% Ammoniak

---

## 6.1.2. Antikörper und Proteine

---

Alle verwendeten Proteine und Antikörper, sowie der für die Gelelektrophorese verwendete Proteinmarker sind in Tabelle 6.2 aufgelistet.

Tabelle 6.2: Verwendete Proteine und Antikörper.

Name	Hersteller	Spezifikationen
Interleukin-8 (IL8)	AK Schmitz, TU Darmstadt, DE	Humanes CXCL8 (1-72)
Interleukin-8-S27C (IL8-Cys)	AK Schmitz, TU Darmstadt, DE	Humanes CXCL8 (1-72) Variante mit C-terminalem Cystein statt Serin
Streptavidin	VWR Chemicals, Radnor, PA (USA)	Streptavidin aus <i>Streptomyces avidinii</i>
Streptavidin-DL550	Columbia Biosciences, Frederick, MD (USA)	Streptavidin aus <i>Streptomyces avidinii</i> konjugiert mit DyLight550
Trypsin	VWR Chemicals, Radnor , PA (USA)	Trypsin aus Schweinepankreas
FITC-anti-human-IL8	Biolegend, San Diego, CA (USA)	FITC-konjugiertes anti-humanes Interleukin-8 IgG Maus, polyklonal
BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	Bovine Serum Albumin Fraktion V
<i>BLUEplus prestained Protein Ladder</i>	Biomol GmbH, Hamburg, DE	Marker für Gelelektrophorese 10-180 kDa

---

## 6.1.3. Synthescharze und Partikel

---

In Tabelle 6.3 sind alle verwendeten Synthescharze und andere funktionalisierte Partikel aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 6.3: Verwendete Synthescharze und andere Partikel.

Name	Hersteller	Spezifikationen
M-PVA-C22	PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Baesweiler, DE	Carboxyfunktionalisierte superparamagnetische Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Partikel in einer Polyvinylalkohol-Matrix. Kapazität 0.95 mmol/g

TCEP Reducing Resin	Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)	Tris(2-carboxyethyl)phosphin immobilisiert auf Agarose
Fmoc-Rink Amid (RAM) Harz	Iris Biochem GmbH, Marktredwitz, DE	Aminomethylpolystyrol-Harz mit Fmoc-geschütztem Rink-Amid Linker. Kapazität 0.59 mmol/g
AmphiSpheres 40 RAM Harz	Agilent Technologies, Santa Clara, CA (USA)	Aminomethylpolystyrol-Harz mit Polyethylenglycol-Spacer und Fmoc-geschütztem Rink-Amid Linker. Kapazität 0.37 mmol/g
TentaGel S AC Harz	Rapp Polymere, Tübingen, DE	Polystyrol-Harz mit Polyethylenglycol-Spacer. Kapazität 0.3 mmol/g
2-Chlorotritylchlorid Harz	PL Polymer Laboratories, Port Moody, CAN	Polystyrol-Harz mit 2-Chlorotritylchlorid-Linker. Kapazität 1.5 mmol/g
TentaGel MB HMBA	Rapp Polymere, Tübingen, DE	Polystyrol-Harz mit Polyethylenglycol-Spacer und 4-(hydroxymethyl)-benzoesäure (HMBA)-Linker. Kapazität 0.23 mmol/g, ø 300 µm
TentaGel M NH <sub>2</sub>	Rapp Polymere, Tübingen, DE	Polystyrol-Harz mit Polyethylenglycol-Spacer. Kapazität 0.24 mmol/g, ø 10 µm

## 6.2. Geräte und Software

Die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind mit Bezeichnung und Herstellerangabe in Tabelle 6.4 aufgeführt.

Tabelle 6.4: Verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
HPLC	ÄKTA Purifier 10	GE Healthcare, München, DE
HPLC	LC20 AD	Shimadzu, Duisburg, DE
PDA	SPD M20A	Shimadzu, Duisburg, DE

Zentrifuge	Rotina 420 R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE
Photometer	Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific, Waltham, US
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR, Darmstadt, DE
Mikrotiterplattenleser	Infinite M1000	Tecan Group AG, Maennedorf, CH
LC-Massenspektrometer <sup>32</sup>	LCMS 2020	Shimadzu, Duisburg, DE
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 efficient	Heidolph, Schwabach, DE
Lyophilisator	Alpha 2-4 LD plus	Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, DE
Tisch-Vakuumpumpe	Laboport	KNF, Freiburg, DE
Peptid-Synthesizer <sup>33</sup>	Liberty Blue	CEM, Kamp-Lintfort, DE
ATR-IR-Spektrometer <sup>34</sup>	Spectrum One FT-IR Sprectrometer	Perkin Elmer, Rodgau, DE
Mikrozentrifugenröhrchen- Magnetseparator	Magnetseparator	Merck, Darmstadt, DE
NMR-Spektrometer <sup>35</sup>	AvanCe 300	Bruker, Hanau, DE
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer, HXP 120 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Belichtungskammer 365 nm	Bio-Link 365	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE
CD-Spektrometer <sup>36</sup>	J-810 Spektropolarimeter	Jasco, Groß-Umstadt, DE

<sup>32</sup> Arbeitskreis Prof. Kolmar, TU Darmstadt

<sup>33</sup> Arbeitskreis Prof. Kolmar, TU Darmstadt

<sup>34</sup> Arbeitskreis Prof. Biesalski, TU Darmstadt

<sup>35</sup> NMR-Abteilung, Dr. Meusinger, TU Darmstadt

<sup>36</sup> Arbeitskreis Prof. Reggelin, TU Darmstadt

Eine Übersicht der verwendeten Software gibt Tabelle 6.5.

Tabelle 6.5: Verwendete Software.

Software	Art der Daten	Hersteller
LabSolutions	Chromatogramme, Spektren	Shimadzu, Duisburg, DE
LCMS Solution	Chromatogramme, Massenspektren	Shimadzu, Duisburg, DE
Unicorn Control	Chromatogramme, Spektren	GE Healthcare, München, DE
Axio Vision	Mikroskopie Daten	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Image J	Bildbearbeitung	Wayne Rasband
Pymol Molecular Graphics System	Peptid- und Proteinstrukturen	Schrödinger, New York, US
i-control 1.9	Fluoreszenzpolarisationsmessungen	Tecan Group AG, Maennedorf, CH
Dichroweb	CD-Spektren	University of London, London, UK
MestReNova 9.1	NMR-Spektren	MestreLab Research
OriginPro 8	Datenverarbeitung	OriginLab

---

## 6.3. Proteinchemische Methoden

---

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit wichtigen proteinchemischen Methoden aufgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle kommerziell erhältlichen Chemikalien und Proteine bei den in Absatz 6.1 aufgeführten Firmen erstanden. Weitere Details zu verwendeten Puffern und der Herkunft der Proteine sind in Absatz 6.1.1 und Absatz 6.1.2 zu finden.

---

### 6.3.1. Proteinexpression

---

*CXCL8 wt*, 72 Aminosäure-Form **1**: *E. coli* BL21 DE3 RIL werden mit dem Vektor pET-22b transformiert, der die codonoptimierte Sequenz für humanes CXCL8 enthält. Die Expression wird nach einem modifizierten Protokoll von Wiese und Schmitz durchgeführt.<sup>[332]</sup>

Die transformierten *E. coli* werden über Nacht bei 200 rpm und 37 °C in 20 mL LB-Medium mit 60 µg/mL Ampicillin anwachsen gelassen. Anschließend werden in einem 2 L Erlenmeyerkolben 800 mL autoklaviertes LB-Medium mit 60 µg/mL Ampicillin mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 200 rpm und 37 °C so lange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.8 bis 1.0 erreicht wird. Um die Expression zu induzieren wird Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zugegeben bis eine Endkonzentration von 0.1 mM erreicht ist. Die Expressionsdauer beträgt 3 h bei 160 rpm und 30 °C. Die Zellsuspension wird bei 4 °C und 5000 g für 45 min zentrifugiert. Das Pellet wird nach Verwerfen des Überstands mit 5 mL Lysis-Puffer aufgeschlämmt, 1.5 Stunden auf Eis gelagert und dabei mehrfach invertiert. Nach Zugabe von 50 µL Triton X-100 werden die Zellen durch dreimalige Ultraschallbehandlung (Sonoplis, Bandelin Electronics) aufgeschlossen, 100 µL 0.1 mg/mL DNase I zugegeben und im Anschluss daran 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wird nun bei 70 °C im Wasserbad für 10 min inkubiert und bei 4 °C und 18000 g für 60 min zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand wird nach Sterilfiltration für die weitere Aufreinigung verwendet.

*CXCL8-S72C*, 72 Aminosäure-Form **2**: *E. coli* BL21 DE3 RIL werden mit dem Vektor pET-22b transformiert, der die codonoptimierte Sequenz für humanes CXCL8 mit C-terminalem Cystein, statt Serin, enthält.<sup>[333]</sup> Die Expression wird basierend auf der des CXCL8 wt nach einem angepassten Protokoll von Wiese und Schmitz wie oben beschrieben durchgeführt.<sup>[332]</sup>

---

### 6.3.2. Proteinreinigung

---

Die Reinigung der Proteine erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird das Lysat am ÄKTA purifier 10 System (GE Healthcare) durch Kationenaustauschchromatographie (5 mL HiTrap SP FF Säule, GE Healthcare) in Puffer A aufgetrennt.<sup>37</sup> Dazu wird die Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min mit dem Lysat beladen, daraufhin mit drei Säulenvolumen (CV) Puffer A gewaschen, um neutrale und negativ geladene Proteine zu eluieren. Im Anschluss daran eluiert ein linearer Gradient von 0-30 % Puffer B über 10 CV die gebundenen Proteine. Diese werden durch einen UV-Detektor bei 280 nm detektiert und fraktioniert bei einer Retentionszeit von 45-60 min gesammelt. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten, werden

---

<sup>37</sup> Durchgeführt von Victoria Engemann, AK Schmitz, TU Darmstadt



---

durch SDS-Gelelektrophorese ermittelt. Diese werden vereinigt, lyophilisiert und in einem Centricon (Vivaspin20, Satorius) gegen Wasser entsalzt.

Der letzte Reinigungsschritt erfolgt durch Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC) an einem LC20-AD Pumpensystem (Shimadzu) über eine Nucleosil C8 RP 250 x 10 mm Säule (Machery & Nagel). In einem linearen Gradienten von 0-80 % Eluent B in Eluent A wird das Protein, bei einer Flussrate von 2 ml/min über 5 CV eluiert und mit einem SPD20A (Shimadzu) Photodiodenarraydetektor (PDA) bei 280 nm detektiert (Retentionszeit 33 min). Das Eluat wird anschließend lyophilisiert. Das Protein wird über eine SDS-PAGE und CD-Spektroskopie charakterisiert und kann mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden.

---

## 6.4. Synthese kleiner Moleküle

---

Im Folgenden werden die Synthesen kleiner Moleküle, die in dieser Arbeit eine Rolle spielen, beschrieben. Sofern nicht anders erwähnt, wurden Standard-Laborchemikalien verwendet oder Chemikalien, die bei den in Absatz 6.1 aufgeführten Firmen kommerziell erworben wurden.

---

### 6.4.1. Analyse- und Charakterisierungsmethoden

---

**Dünnschichtchromatographie (DC):** Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs und ersten Analytik der Reinheit der Produkte, wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt. Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck (TLC Silica F<sub>254</sub>) mit UV-Indikator verwendet. Dabei können ungesättigte Kohlenwasserstoffe und aromatische Verbindungen durch Bestrahlung mit UV-Licht auf der Platte detektiert werden. Andere Verbindungen können durch Eintauchen in 1%ige wässrige Kaliumpermanganat-Lösung und anschließendes Erhitzen mit der Heißluftpistole sichtbar gemacht werden. Amine lassen sich durch Besprühen mit Ninhydrin-Lösung und Erhitzen detektieren.

Vor der Durchführung der Chromatographie wird die Kammer mit dem verwendeten Laufmittel verschlossen um die Gasphase in der Kammer mit Laufmitteldampf zu sättigen. Es werden etwa 2 mL Eluent verwendet und nach Detektion der Substanzen deren R<sub>f</sub> Wert durch Division der Entfernung des Produktflecks von der Startlinie mit der Entfernung von Startlinie zu Laufmittelfront berechnet.

**Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)<sup>38</sup>:** Kleinere Moleküle werden mit <sup>1</sup>H-NMR bzw. <sup>13</sup>C-NMR identifiziert. Die Messungen werden an einem Avance II NMR-Spektrometer von Bruker bei 300 MHz durchgeführt und als interner Standard wird Tetramethylsilan (TMS) verwendet. Es werden etwa 0.7 mL Probelösung in deuteriertem Lösemittel für die Analyse eingesetzt. Die Identität der Probe wird durch die chemische Verschiebungen (in parts per million – ppm), die Integrale der einzelnen Signale und falls nötig durch die Signalaufspaltung (s – Singulett, d – Dublett, t – Triplet, m – Multiplett) bestimmt. Durch das Integralverhältnis von Produkt und Edukt zugeordneten Signalen können Rückschlüsse auf die Reinheit der Probe gezogen werden.

---

<sup>38</sup> Durchgeführt in der NMR-Abteilung von Dr. Reinhardt Meusinger, TU Darmstadt.

---

**Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)<sup>39,[398]</sup>** Zur Identifizierung der Produkte und von Peptomeren in verschiedenen HPLC-Fraktionen wird ein LCMS2020-System von Shimadzu verwendet. Bei diesem Geräteaufbau wird die zu bestimmende Substanz zunächst über eine RP18-Säule mit einem Acetonitril/Wasser Gradienten getrennt und anschließend zur Massenbestimmung in eine Ionisationskammer geführt. Es werden pro Messung etwa 100  $\mu\text{L}$  Probenlösung in wässriger Lösung mit niedrigem AcN Anteil benötigt. Die Proben wurden sowohl im positiven als auch im negativen Ionisierungsmodus gemessen. Es wurden anschließend die Spektren mit größerer Ionenausbeute ausgewertet.

### **Fluoreszenzanisotropie**

14 1.5 mL Mikrozentrifugenröhrchen werden mit jeweils 31.5  $\mu\text{L}$  Puffer C gefüllt. In das erste Probengefäß werden 31.5  $\mu\text{L}$  einer 2 mg/mL IL8-Lösung gegeben, gemischt und 31.5  $\mu\text{L}$  Lösung in das nächste Gefäß pipettiert. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt bis in allen 14 Mikrozentrifugationsröhrchen 31.5  $\mu\text{L}$  einer IL-8 Lösung mit 1:2 absteigender Konzentration hergestellt wurde. In jedes dieser Gefäße werden nun 3.5  $\mu\text{L}$  einer 2  $\mu\text{M}$  Lösung fluoreszenzmarkiertes Peptid oder Peptoid gegeben und gemischt. Als Kontrolle für ungebundenen Analyten werden 31.5  $\mu\text{L}$  Puffer C ebenfalls mit dem Peptid versetzt. Es werden jeweils 10  $\mu\text{L}$  jeder Lösung in je eine Kavität einer schwarzen *low-volume* 384-well Mikrotiterplatte mit transparentem Boden pipettiert. Dabei sollten je drei Kavitäten pro Konzentrationswert für die Dreifachbestimmung genutzt werden. Als Referenz dient reiner Puffer C. Die Platte wird zentrifugiert und im Tecan Infinite M 1000 sowohl die Fluoreszenzintensität, als auch die Fluoreszenzpolarisation und –anisotropie gemessen. Für Fluorescein-markierte Peptide wird bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen, für TAMRA-markierte Peptide wird bei 530 nm angeregt und die Emission bei 579 nm gemessen. Der G-Faktor wurde bestimmt und beträgt 1.158.

### **CD-Spektroskopie<sup>40</sup>**

Es wird 1 mL einer 25  $\mu\text{M}$  Lösung des Analyten in Puffer C hergestellt und am J-810 Spektropolarimeter von Jasco vermessen. Es wird der Bereich von 195 nm bis 260 nm in Zehnfachbestimmung bei konstanter Temperatur von 20 °C gegen einen Leerwert von Puffer C gescannt. Dabei wird in 1nm Intervallen mit einer Scanrate von 50 nm/min gemessen.

---

<sup>39</sup> Durchgeführt von Heiko Fittler, Sasha Knauer, Hendrik Schneider und Sebastian Hörner, AK Kolmar, TU Darmstadt.

<sup>40</sup> Betreut und durchgeführt von Philipp Czechowski, AK Reggelin, TU Darmstadt

---

## 6.4.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

---

Im Folgenden werden allgemeinen Arbeitsvorschriften (AAV) für die weiteren Synthesen aufgeführt.<sup>[398]</sup>

### **AAV0: Quellen des Harzes:**

Die verwendeten Harzpartikel werden zunächst in Dichlormethan (DCM) für mindestens 20 min auf dem Schüttler gequollen. Für 100 mg Harz wird mindestens 1 mL DCM verwendet. Im Anschluss daran werden die Partikel zweimal mit Dimethylformamid (DMF) gewaschen, für weitere 10 min in DMF gequollen und können nun für die darauf folgenden Reaktionen eingesetzt werden.

### **AAV1: Kupplung der ersten Aminosäure an den HMBA-Linker:**

3 Äquivalente der Fmoc geschützten Aminosäure, 0.1 Äquivalente 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) und 4 Äquivalente Diisopropylcarbodiimid (DIC) werden in DMF gelöst und ca. 5 min bei 600 rpm auf dem Schüttler aktiviert. Die Reaktionslösung sollte mindestens eine Konzentration von 0.2 mM Aminosäure aufweisen. Die aktivierte Mischung wird anschließend zu den Harz-Partikeln in eine Fritte gegeben und für 2 Stunden auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wird das Harz nach AAV6 gewaschen.

### **AAV2: Kupplung der ersten Aminosäure an ClTrtCl-Linker**

1 Äquivalent der Fmoc geschützten Aminosäure und 5 Äquivalente Diisopropylethylamin (DIPEA) werden in DMF gelöst und für ca. 5 min auf dem Schüttler bei 600 rpm aktiviert. Die Reaktionslösung sollte mindestens eine Konzentration von 0.2 mM Aminosäure aufweisen. Die aktivierte Mischung wird anschließend zu den Harz-Partikeln in eine Fritte gegeben und für etwa 2 Stunden auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Das Harz wird nach AAV6 gewaschen und anschließend wird eine 1:1:1 (v:v:v) Mischung von DCM, Methanol und DIPEA hinzugegeben und eine halbe Stunde bei 600 rpm geschüttelt. Im Anschluss wird das Harz nach AAV6 gewaschen.

### **AAV3: Acylierung mit Bromessigsäure (BrAc) oder Chloressigsäure (ClAc)**

10 Äquivalente BrAc oder ClAc werden in DMF gelöst und in einer Konzentration von 1.2 M zum Harz gegeben. 9 Äquivalente DIC werden zugesetzt und die Reaktionslösung wird für 30-60 min bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss daran wird das Harz nach AAV6 gewaschen. Um Nebenreaktionen zu vermeiden, wird die Acylierung mit ClAc für Peptoidsequenzen mit ungeschützten heterocyclischen Aminen (Histamin, Tryptamin) empfohlen.<sup>[2]</sup>

### **AAV4: Aminierung in der Peptoidsynthese**

Zum nach AAV3 acylierten Harz werden 20 Äquivalente primäres Amin als 2 M Lösung in N-Methylpyrrolidon (NMP), DCM oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. Amine, die als Hydrochlorid vorliegen werden stattdessen in 10 Äquivalenten als 1 M Lösung in 1:1 (v:v) DMSO:DIPEA eingesetzt. Die Reaktionslösung wird bei der Aminierung eines mit BrAc acylierten Harzes für mindestens 2 Stunden bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Bei Aminierung eines mit ClAc acylierten Harzes sollte die Reaktionsdauer mindestens 3 Stunden betragen. Anschließend wird das Harz nach AAV6 gewaschen.

#### **AAV5a: Kupplung von Aminosäuren oder 5(6)Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (5(6)-Carboxy-TAMRA) 24.**

3 Äquivalente der Fmoc-geschützten Aminosäure, 3 Äquivalente 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und 6 Äquivalente DIPEA werden in DMF gelöst und für ca. 5 min auf dem Schüttler aktiviert. Die Reaktionslösung sollte mindestens eine Konzentration von 0.2 mM (Amino-)Säure aufweisen. Die aktivierte Mischung wird anschließend zu 1 Äquivalent der Harz-Partikel in eine Fritte gegeben und für etwa 40 min auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wird die Kupplung wiederholt und das Harz nach AAV6 gewaschen. Die Markierung mit TAMRA wird analog zur Kupplung einer Aminosäure durchgeführt. Es werden 3 Äquivalente 5(6)-Carboxy-TAMRA eingesetzt.

#### **AAV5b: Kupplung 5(6)-Carboxyfluorescein (FAM).**

1.2 Äquivalente 5-(6)Carboxyfluorescein (FAM), 3 Äquivalente HBTU und 6 Äquivalente DIPEA werden in DMF gelöst und für ca. 5 min auf dem Schüttler aktiviert. Die Reaktionslösung sollte mindestens eine Konzentration von 0.1 mM FAM aufweisen. Die aktivierte Mischung wird anschließend zu den Harz-Partikeln in eine Fritte gegeben und für etwa zwei Stunden auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Da in einer Nebenreaktion Fluorescein-Dimere über eine Esterbindung entstehen können, wird im Anschluss an die Markierung eine Lösung von 20 % Piperidin in DMF auf das Harz gegeben, 10 min auf dem Schüttler inkubiert und damit mehrfach gewaschen.<sup>[435]</sup> Anschließend wird das Harz nach AAV6 gewaschen.

#### **AAV6: Waschen des Harzes**

Die über dem Harz stehende Lösung wird über die Fritte ablaufen gelassen und die Partikel dreimal mit DMF, dreimal mit DCM und wieder dreimal mit DMF gewaschen. Wenn die Partikel getrocknet werden sollen, werden sie anschließend dreimal mit Methanol (MeOH) gewaschen, für einige Sekunden im Luftstrom der Tischvakuumpumpe vorgetrocknet und anschließend im Hochvakuum des Lyophilisators mindestens 3 Stunden getrocknet.

#### **AAV7: Quantitative Bestimmung der Harz-Beladung**

Etwa 2-5 mg der getrockneten und noch Fmoc geschützten Partikel werden abgewogen und für eine halbe Stunde in 200 µL einer 2%igen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en-Lösung (DBU) in DMF auf dem Schüttler bei 600 rpm geschüttelt. Anschließend werden 300 µL Acetonitril (AcN) zugegeben und eine weitere halbe Stunde geschüttelt. 25 µL der Lösung über den Partikeln werden abgenommen und in einem weiteren Gefäß mit 475 µL AcN verdünnt. Nach Vortexen der Lösung werden wiederum 100 µL abgenommen und auf 1.25 mL mit AcN verdünnt. Von der resultierenden Lösung wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 304 nm im Spektrometer bestimmt; als Blindwert dient eine Lösung, die wie vorher beschrieben ohne Zugabe von Harzpartikeln hergestellt wird. Die Absorption dieser Lösung wird von denen der Probelösungen abgezogen. Die Beladung der Partikel kann mit folgender Formel bestimmt werden:<sup>[458]</sup>

$$\text{Beladung} = \frac{A_{304nm} * 16,4}{m_{\text{Partikel}} [\text{mg}]} \quad [\text{mmol/g}]$$

---

#### **AAV8: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe**

Das Harz wird für 10 min in einer 20% Piperidin-Lösung in DMF auf dem Schüttler bei 600 rpm geschüttelt. Anschließend werden die Partikel mit DMF gewaschen und abermals für 20 min in der 20% Piperidin-Lösung geschüttelt. Im Anschluss wird das Harz nach AAV6 gewaschen.

#### **AAV9: Chloranil Test<sup>[277-279]</sup>**

Einige trockene Harzpartikel werden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Es werden 40  $\mu$ L einer 2%igen Chloranil-Lösung in DMF und 40  $\mu$ L einer 2%igen Acetaldehyd-Lösung in DMF zugegeben. Eine Blaufärbung der Partikel nach etwa 5 min zeigt die Anwesenheit freier Amino-Gruppen an.

#### **AAV10: Selektives Entschützen von Trityl- (Trt) und Methyltrityl- (Mtt) Schutzgruppen**

Zum selektiven Abspalten von Trt- und Mtt-Schutzgruppen unter Erhalt aller anderen säurelabilen Schutzgruppen und Linker des verwendeten Harzes wird eine frische Lösung von 5 % Trifluoressigsäure (TFA) für Trt bzw. 1.5 % TFA für Mtt und jeweils 2.5 % Triisopropylsilan (TIPS) angesetzt.<sup>[400]</sup> Für je 100 mg Harz wird etwa 1 mL Lösung benötigt. Das Harz wird mit dieser Lösung für 2 min auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert und dieser Vorgang wird 8mal wiederholt. Anschließend wird das Harz nach AAV6 gewaschen.

#### **AAV11: Selektives Entschützen der Allyloxycarbonyl- (Alloc) Schutzgruppe**

Zum Abspalten der orthogonalen Alloc-Schutzgruppe werden zunächst 3 Äquivalente Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in einer 37:2:1 (v:v:v) Lösung von Chloroform, Essigsäure und N-Methylmorpholin gelöst. Es werden etwa 15 mL Lösung pro Gramm Harz benötigt und es wird ein stetiger Stickstoffstrom durch die Lösung geleitet, bis sich der Metallkomplex gelöst hat. Anschließend wird die Lösung zum Harz gegeben und 3 Stunden bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Lösung wird im Anschluss daran abgelassen und das Harz mehrfach abwechselnd mit 0.5 % DIPEA in DMF und 0.5 % Natriumdiethyldithiocarbamat in DMF gewaschen, bis die Waschlösungen farblos bleiben. Anschließend wird das Harz nach AAV6 gewaschen.

#### **AAV12: Spaltung säurelabiler Harzlinker und Seitenkettenschutzgruppen von Peptomeren**

Eine Lösung bestehend aus 88 % TFA, 5 % Dithiothreitol (DTT), 2 % Wasser, 2.5 % Anisol und 2.5 % TIPS wird frisch angesetzt. Für 100 mg Harz wird etwa 1 mL Lösung benötigt. Das Harz wird maximal 2 h auf dem Schüttler bei 600 rpm in der Lösung inkubiert. Im Anschluss daran wird die Reaktionslösung in die zehnfache Menge eisgekühlten Methyl-*tert*-butylethers (MTBE) gegeben, das Harz noch einmal mit wenig Abspalllösung gewaschen und die Waschlösung ebenfalls zum Ether gegeben. Die Lösung wird gevortext, 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend in flüssigem Stickstoff gekühlt. Das entstandene Präzipitat wird für 5 min bei 1500 g zentrifugiert, mit kaltem Ether gewaschen und abermals zentrifugiert. Der Rückstand wird in möglichst wenig 50% Acetonitril (AcN) aufgenommen, bis er sich vollständig löst, und im Anschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Trockne lyophilisiert.

### AAV13: Spaltung basenlabiler Harzlinker

Das nach AAV6 gewaschene und getrocknete Harz wird in einem offenen Gefäß in einen Exsikkator gefüllt mit einer 25 % Ammoniaklösung gestellt. Nach Verschließen wird so lange Vakuum gezogen, bis sichtbare Blasen aus der Ammoniaklösung aufsteigen. Nach etwa 5 min wird abermals Vakuum gezogen und das Harz mindestens 4 Stunden im Ammoniakdampf inkubiert. Anschließend wird das Harz mit 50 % AcN gewaschen und die entstandene Waschlösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Trockne lyophilisiert.

### AAV14: Automatisierte Peptidsynthese am Peptidsynthesizer mit Mikrowellenreaktor<sup>41</sup>

Die automatisierte Peptidsynthese erfolgt nach einem Standardprotokoll für Fmoc/tBu-SPPS an einem LibertyBlue Synthesizer der Firma CEM mit Discover Mikrowellenreaktor. Dabei wird jede Aminosäure als 0.2 M Lösung eingesetzt und jede Kupplung wiederholt (Doublecoupling). Aktiviert werden die Aminosäuren mit einer Lösung aus 5 Äquivalenten Ethylcyano(hydroxyimino)acetat (Oxyma), 5 Äquivalenten DIC und 3 Äquivalenten Aminosäure in DMF. Die N-terminale Entschützung der wachsenden Kette wird mit 0.1 M Oxyma und 20 % Piperidin in DMF durchgeführt. Nähere Details zum Synthesizer Programm und ESI-MS Einstellungen können Fittler *et. al.*<sup>[459]</sup> entnommen werden.

### AAV15: Reinigung von Peptiden und Peptomeren über RP-HPLC

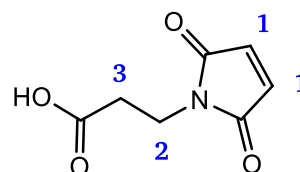
Lyophilisierte Rohprodukte von Peptiden und Peptomeren werden mit 1 mL Eluent A versetzt und durch Vortexen gelöst. Substanzen, die nicht vollständig gelöst sind, werden sukzessive mit 50 µL Eluent B versetzt und gevortext, bis sie sich vollständig in Lösung befinden. Das Gesamtvolumen der Lösung darf dabei 1.5 mL nicht überschreiten. Die Startbedingungen der verwendeten Methode sind abhängig von der Zusammensetzung der Lösemittel der Probe und beginnen beim gleichen Anteil Eluent B. Die Säule (Supelco Discovery HS C18 250 x 10 mm - Sigma Aldrich) wird zunächst bis zur Basislinienstabilisierung (Detektion bei 280 nm) bei einer Flussrate von 2 mL/min mit dieser Eluentenzusammensetzung äquilibriert. Anschließend wird die Lösung über eine 2 mL Injektorschleife injiziert und bei einer Flussrate von 2 mL/min isokratisch gefahren. Nach 1 CV werden die Analyten für 5 CV (lineare Peptomere) oder 3 CV (zyklische Peptomere) in einem linearen Gradient bis 80% Eluent B separiert, eluiert und die entsprechenden Fraktionen in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Es folgt ein Plateau bei 100% Eluent B um die Säule zu spülen. Am Ende der Methode wird die Säule wieder für 2 CV auf die Startbedingungen zurückgesetzt. Die Detektion der Analyten wird durch einen Photodiodenarraydetektor (PDA) gewährleistet. Die Detektionswellenlängen sind 280nm und 254nm für aromatische Aminosäuren. Abhängig von der Markierung des Analyten wird zusätzlich die Anregungswellenlänge des entsprechenden fluoreszierenden Farbstoffs detektiert (440 nm – FAM-markierte Substanzen, 535 nm – TAMRA-markierte Substanzen,). Das Eluat wird anschließend lyophilisiert und der Rückstand bei -20 °C gelagert.

<sup>41</sup> Betreut durch Dr. Olga Avrutina und Dana Schmidt, AK Kolmar, TU Darmstadt



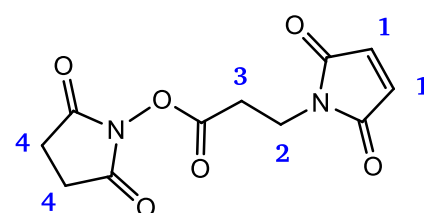
### 6.4.3. Synthese von Linker-Molekülen und Markern

**3-(Maleimido)propionsäure 79:** Eine Lösung von 5.0 g (56.1 mmol, 1 äq)  $\beta$ -Alanin in 30 mL konzentrierter Essigsäure wird mit 30 mL einer Lösung von 5.5 g (56.1 mmol, 1 äq) Maleinsäureanhydrid in konzentrierter Essigsäure versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird die Essigsäure am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt ist ein weißer Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet wurde. Die Ausbeute beträgt 10.37 g (98 % d. Th.).



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz; DMSO- $\text{D}_6$ ; 300K; TMS):  $\delta_{\text{H}}$  (in ppm) = 6.99 (s, 2H, CH (1)), 3.57 (t,  $^3J = 7.35$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  (2)), 2.46 (t,  $^3J = 7.35$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  (3)).

**3-(Maleimido)propionsäure-N-hydroxysuccinimidester 80:** Eine Lösung aus 10.3 g (55.8 mmol, 1 äq) 3-(Maleimido)propionsäure 79 in 50 mL DMF wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren werden erst 8.0 g (69.8 mmol, 1.25 äq) N-Hydroxysuccinimid (NHS) und schließlich 23.0 g (139.4 mmol, 2 äq) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt und das entstandene

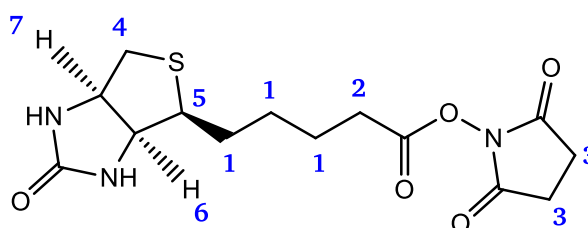


Präzipitat abfiltriert und verworfen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingedunstet und die gelblich-braune Lösung auf 100 mL Wasser gegossen. Das Präzipitat wird abgesaugt, mehrfach mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet. Das Produkt ist ein leicht bräunlicher Feststoff. Die Ausbeute beträgt 11,2 g (76 % d. Th.).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz; DMSO- $\text{D}_6$ ; 300K; TMS):  $\delta_{\text{H}}$  (in ppm) = 6.99 (s, 2H, CH (1)), 3.67 (t,  $^3J = 6.70$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  (2)), 2.92 (t,  $^3J = 6.70$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  (3)), 2.75 (s, 4H,  $\text{CH}_2$  (4)).

**Biotin-N-hydroxysuccinimidester, Biotin-NHS 81:**<sup>[460]</sup>

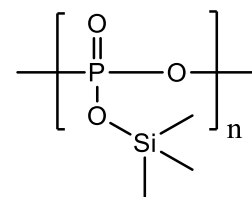
Eine Lösung aus 2.0 g (8.2 mmol, 1 äq) D-Biotin und 0.94 g (8.2 mmol, 1 äq) NHS in 60 mL DMF wird auf 70 °C erhitzt und unter Rühren mit 2.2 g (10.7 mmol, 1.3 äq) DCC versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt und anschließend das entstandene Präzipitat abfiltriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingedunstet, mit 50 mL Diethylether versetzt und 30 min gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt, mehrfach mit kaltem Isopropanol gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 2.1 g (75 % d. Th.) eines weißen kristallinen Feststoffs.



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz; DMSO- $\text{D}_6$ ; 300K; TMS):  $\delta_{\text{H}}$  (in ppm) = 4.33-4.06 (m, 2 H, CH (6, 7)), 3.07 (m, 1 H, SCH (5)), 2.95 (s, 4 H,  $\text{CH}_2$  (3)), 2.73 (d, 2 H,  $\text{SCH}_2$  (4)), 2.56 (t, 2 H,  $\text{CH}_2$  (2)), 1.66-1.03 (m, 6 H,  $\text{CH}_2$ )).

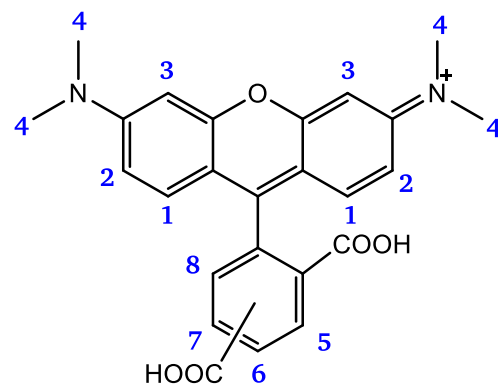


**Trimethylsilylpolyposphat-Lösung in Chloroform 82:**<sup>[461]</sup> Eine Lösung aus 20 g (70 mmol, 1 äq) Phosphorpentoxid und 50 mL (247 mmol, 3.5 äq) Hexamethyldisiloxan in 100 mL Chloroform wird für 40 min unter Stickstoffatmosphäre und bei 61 °C unter Rückfluss erhitzt. Die entstandene, klare Lösung wird ohne weitere Aufarbeitung oder Charakterisierung direkt eingesetzt und kann im Kühlschrank für mehrere Monate aufbewahrt werden.



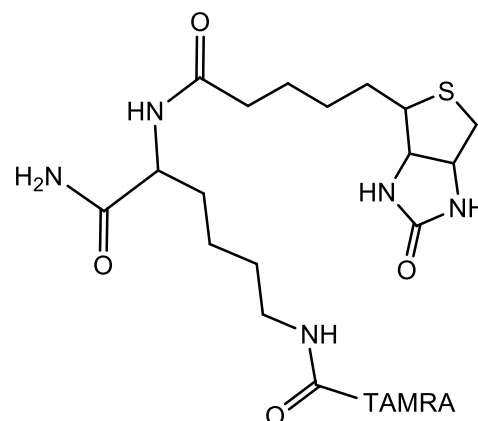
**5(6)-Carboxy-Tetramethylrhodamin, 5(6)Carboxy-TAMRA 24:**<sup>[436]</sup>

Eine Lösung aus 20.58 g (150 mmol, 1 äq) 3-Diaminophenol und 34.58 g (180 mmol, 1.2 äq) Benzol-1,2,4-tricarbonsäure-1,2-anhydrid wird bei 110 °C unter Rückfluss für 24 h erhitzt. Der Überstand wird vom entstandenen braun-violetten Präzipitat abdekantiert und der Feststoff wird mehrfach mit 50 mL kaltem Toluol gewaschen, bis keine bräunliche Färbung der Lösung mehr erkennbar ist. Der Rückstand wird in einem 1:1 (v:v) Gemisch von Methanol/Toluol gelöst und das Methanol am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das Präzipitat wird abfiltriert und dieser Schritt wird zweimal wiederholt, um restliches Edukt abzutrennen. Das Zwischenprodukt wird getrocknet und gewogen. Die Ausbeute beträgt 30.9 g (60 % d.Th.) eines braunen, kristallinen Feststoffs. 6.5 g (19.17 mmol, 1 äq) des Zwischenprodukts wird mit 3.51 g (25.59, 1.3 äq) 3-Diaminophenol in 150 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 40 mL Trimethylsilylpolyposphat-Lösung in Chloroform **82** wird das Reaktionsgemisch für 3 h bei 160 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeeengt und der violett-rote Rückstand in 150 mL 5 % Natronlauge aufgenommen und über Nacht bei RT gerührt. Im Anschluss daran wird die Lösung mit 300 mL Wasser verdünnt und der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf <3 gebracht. Das violette Präzipitat wird abgesaugt und mit viel kaltem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute beträgt 3.14 g (37 % d. Th.) eines rot-braunen, kristallinen Feststoffs.



<sup>1</sup>H-NMR (6'-Isomer)  $\delta_H$  (300 MHz; MeOH-D<sub>4</sub>; 300K; TMS): 8,35 (d, 2 H, ArH (5,6)), 7,95 (d, 1 H, ArH (8)), 7,16 (dd, 2 H, ArH (1)), 7,04 (d, 2 H, ArH (2)), 6,95 (s, 2 H, ArH (3)), 3,30 (s, 12 H, CH<sub>3</sub> (4)). ESI-MS m/z (%): 431,17 (100, [M+1H]<sup>+</sup>). Erwartete Masse: 430,16 g/mol.

**TAMRA-Biotin 36:** 100 mg (24  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel MB HMBA Harz in einer 5 mL Spritze mit Filterfritte wird nach AAV0 in DCM gequollen und das Lösemittel abgelassen. Das Harz wird nach AAV5a mit 45 mg (72  $\mu$ mol, 3 äq) Fmoc-Lysin(Mtt)-OH zur Reaktion gebracht, nach AAV6 gewaschen und die Methyltrityl-Schutzgruppe nach AAV10 entfernt. Es wird abermals nach AAV6 gewaschen und das freie Amin der Seitenkette nun nach AAV5a mit 93 mg (72  $\mu$ mol, 3 äq) 5(6)-Carboxy-TAMRA **24** markiert. Nach anschließendem Waschen nach AAV6 wird die Fmoc-Schutzgruppe nach AAV8 entfernt, gewaschen (AAV6) und mit 24.5 mg (72  $\mu$ mol, 3 äq) Biotin-NHS **81** in 1 mL DMF versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für mindestens 3 h bei RT und 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert und anschließend nach AAV6 gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil

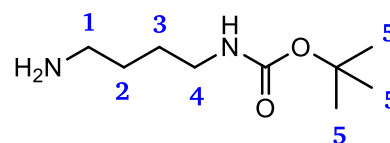


der Partikel wird abgenommen nach AAV0 in DCM gequollen und nach AAV6 gewaschen. Das Harz wird dreimal mit Puffer C gewaschen und eine Stunde in Puffer C bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Das Rohprodukt wird nach AAV13 vom Harz abgespalten. Die Reinigung erfolgt durch RP-HPLC (2 CV 0 % Eluent B, 4 CV linearer Gradient von 0-80 % Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 44.1 min und 44.4 min.

ESI-MS,  $m/z$  (%): 783,27 (100)  $[M-H]^+$ . Erwartete Masse: 784.34 g/mol.

#### 6.4.4. Synthese geschützter primärer Amine für die Peptidsynthese<sup>42</sup>

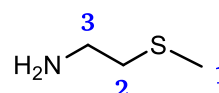
*N*-Boc-1,4-Diaminobutan, *Boc-NLys*<sup>+</sup> **45**:<sup>[429]</sup> Eine Lösung von 40.0 g (456 mmol, 10.4 äq) 1,4-Diaminobutan **53** in 300 mL Chloroform wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Über 4 h wird langsam eine Lösung von 19 g (87.4 mmol, 1 äq) Di-*tert*-butyldicarbonat ( $Boc_2O$ ) in 150 mL



Chloroform unter starkem Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt und im Anschluss daran dreimal mit 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird gesammelt, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt, und es bleibt ein farblos bis leicht gelbliches, hochviskoses Öl zurück. Die Ausbeute beträgt 15.5 g (96 % d. Th.).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz;  $CDCl_3$ ; 300K; TMS):  $\delta_H$  = 3.09 (m, 2 H,  $CH_2(4)$ ), 2.67 (t, 2 H,  $CH_2(5)$ ), 1.45-1.50 (m, 4 H,  $CH_2(3, 2)$ ), 1.40 (s, 9 H,  $CH_3(5)$ ).  $R_f$  (MeOH/DCM, 1:1 (v:v)) = 0.4.

2-Aminoethylmethylsulfid, *NMet*<sup>+</sup> **46**:<sup>[462],[433]</sup> Ein Gemisch aus 11 mL (176 mmol, 1.1 äq) Methyljodid und 18.18 g (160 mmol, 1 äq) Cysteamin Hydrochlorid **60** in 230 mL Ethanol wird unter starkem Rühren über eine Stunde mit einer Lösung aus 17.95 g Kaliumhydroxid in 140 mL Ethanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wird drei Tage bei



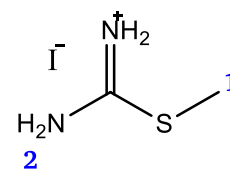
RT gerührt, das Präzipitat abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Das entstandene Öl wird in 100 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung aufgenommen und dreimal mit 30 mL Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt und es entsteht eine farblose ölige Flüssigkeit. Die Ausbeute beträgt 12,3 g (78 % d. Th.).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz;  $CDCl_3$ ; 300K; TMS):  $\delta_H$  (in ppm) = 3.84 (t,  $^3J$  = 6.60 Hz, 2 H,  $CH_2(3)$ ), 2.55 (t,  $^3J$  = 6.60 Hz, 2 H,  $CH_2(2)$ ), 2.05 (s, 3 H,  $CH_3(1)$ ).

$R_f$  (MeOH/DCM, 1:1(v:v))=0.25.

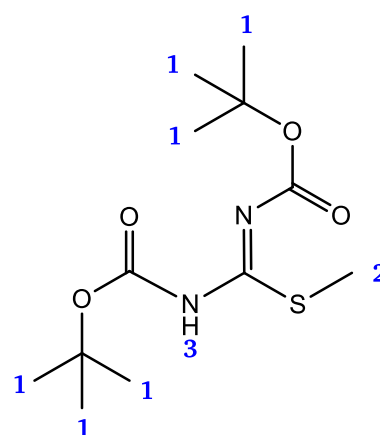
<sup>42</sup> Synthesen wurden zu Teilen von den Praktikanten Julia Wack und Andreas Baumruck in einem Forschungspraktikum durchgeführt.

**2-Methylisothiuroniumiodid 58:**<sup>[432]</sup> Ein Gemisch aus 4.1 mL (65 mmol, 1 äq) Methyljodid und 5.0 g (65 mmol, 1 äq) Thioharnstoff **57** in 50 mL Methanol wird für 90 min unter Rückfluss erhitzt und anschließend am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Die erhaltenen Kristalle werden zweimal mit 15 mL



Diethylether gewaschen und über eine Saugflasche trocken gesaugt. Die Ausbeute beträgt 12.78 g (90% d. Th.) eines weißen kristallinen Feststoffs.  
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; DMSO-D<sub>6</sub>; 300K; TMS): δ<sub>H</sub> = 8.89 (s, 4 H, NH<sub>2</sub> (2)), 2.55 (s, 3 H, CH<sub>3</sub> (1)).  
 R<sub>f</sub> (Aceton) = 0.73.

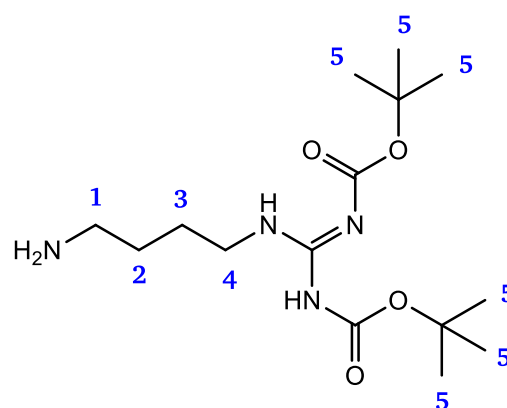
**Bis-(tert-butoxycarbonyl)-S-methylisothioharnstoff 59:**<sup>[432]</sup> Eine Lösung aus 12 g (55 mmol, 2 äq) Boc<sub>2</sub>O in 300 mL DCM wird unter starkem Rühren über 30 min zu einer Lösung aus 6.0 g (27.5 mmol, 1 äq) **58** in 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt und die organische Phase anschließend dreimal mit je 60 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Der erhaltene wachsartige Feststoff wird anschließend für eine Stunde in 200 mL einer 9:1 (v:v) Lösung H<sub>2</sub>O/EtOH suspendiert, abgesaugt, zweimal mit kaltem Wasser gewaschen und trocken gesaugt. Die Ausbeute beträgt 7.8 g (97% d. Th.) eines weißen Feststoffs.



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; 300K; TMS): δ<sub>H</sub> = 11.61 (s, 1 H, NH (3)), 2.39 (s, 3 H, CH<sub>3</sub> (2)), 1.52 (s, 18 H, CH<sub>3</sub> (1)). R<sub>f</sub> (CyHex/EE, 1:1 (v:v)) = 0.9.

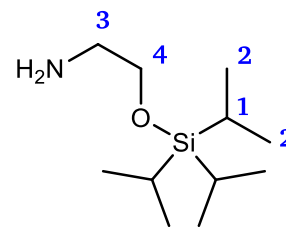
**N,N-Di-Boc-guanidin-1,4-diaminobutan, Boc<sub>2</sub>-NArg<sup>+1</sup> 40:**<sup>[432]</sup>

Eine Lösung von 6.0 g (20.5 mmol, 1 äq) **59** in 50 mL DCM wird über eine Stunde unter starkem Rühren zu einer Lösung von 5.0 g (57 mmol, 2.6 äq) 1,4-Diaminobutan **53** in 30 mL DCM zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 90 min bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung zweimal mit jeweils 40 mL H<sub>2</sub>O und zweimal mit je 40 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Das zunächst erhaltene farblose Öl kristallisiert über Nacht im Kühlschrank zu einem weißen Wachs aus. Die Ausbeute beträgt 6.7 g (96 % d. Th.).



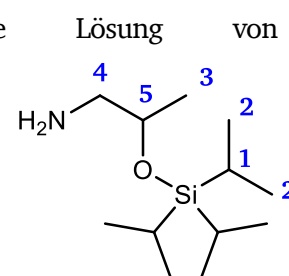
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; 300K; TMS): δ<sub>H</sub> = 3.35 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>(4)), 2.66 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>(1)), 1.52-1.58 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>(2,3)), 1.42 (s, 18 H, CH<sub>3</sub>(5)). R<sub>f</sub> (MeOH) = 0.22.

2-((Triisopropylsilyl)oxy)ethylamin, *TIPS-NSer*<sup>+1</sup> **48**:<sup>[276],[430]</sup> Eine Lösung von 13 mL Triethylamin (TEA) und 3.4 mL (50 mmol, 1 äq) Ethanolamin **54** in 50 mL DCM wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter starkem Rühren wird dem Reaktionsgemisch über eine Stunde eine Lösung von 9.6 g (50 mmol, 1 äq) Triisopropylsilylchlorid (TIPS-Cl) in 50 mL DCM zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für einen Tag bei RT gerührt und im Anschluss an die Reaktionszeit mit 50 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Die Lösung wird dreimal mit jeweils 40 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 150 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Die Ausbeute beträgt 9.9 g (91% d. Th.) eines farblosen Öls.



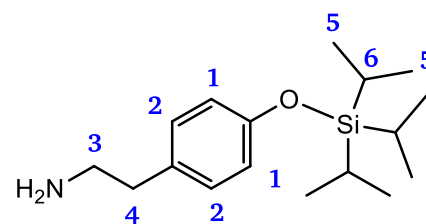
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; 300K; TMS):  $\delta_H$  (in ppm) = 3.70 (t, <sup>3</sup>J = 5.26 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>(4)), 2.79 (t, <sup>3</sup>J = 5.28 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>(3)), 1.07 (d, <sup>3</sup>J = 5.87 Hz 18 H, CH<sub>3</sub>(2)), 1.03 (q, <sup>3</sup>J = 5.88 Hz, 3 H, CH(1)).  $R_f$  (CyHex/EE, 1:1 (v:v)) = 0.22.

2-((Triisopropylsilyl)oxy)propylamin, *TIPS-NThr*<sup>+1</sup> **49** :<sup>[430]</sup> Eine Lösung von 13 mL Triethylamin (TEA) und 3.75 g (50 mmol, 1 äq) 1-Aminopropan-2-ol **55** in 50 mL DCM wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter starkem Rühren wird dem Reaktionsgemisch innerhalb von einer Stunde eine Lösung von 9.6 g (50 mmol, 1 äq) Triisopropylsilylchlorid (TIPS-Cl) in 50 mL DCM zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für einen Tag bei RT gerührt und im Anschluss an die Reaktionszeit mit 50 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Die Lösung wird dreimal mit jeweils 40 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 150 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Die Ausbeute beträgt 10.4 g (94% d. Th.) eines farblosen Öls.



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; 300K; TMS):  $\delta_H$  (in ppm) = 3.92 (m, 1 H, CH(5)), 2.65 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>(4)), 1.15 (d, 3 H, CH<sub>3</sub>(3)), 1.06 (d, <sup>3</sup>J = 5.95 Hz, 18 H, CH<sub>3</sub>(2)), 1.01 (q, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 3 H, CH(1)).  $R_f$  (CyHex/EE, 1:1 (v:v)) = 0.18.

4-((Triisopropylsilyl)oxy)-phenylethylamin *TIPS-NTyr*<sup>+1</sup> **51**:<sup>[431]</sup> Zu einer Lösung von 1.56 g (22.8 mmol, 2 äq) Imidazol und 1.56 g (11.4 mmol, 1 äq) Tyramin **56** in 40 mL DMF wird unter starkem Rühren 2.84 g (14.8 mmol, 1.3 äq) Triisopropylsilylchlorid (TIPS-Cl) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für einen Tag bei RT gerührt und im Anschluss mit 50 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Die Lösung wird zweimal mit jeweils 50 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 75 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Die Ausbeute beträgt 2.78 g (83% d. Th.) eines gelblichen Öls.



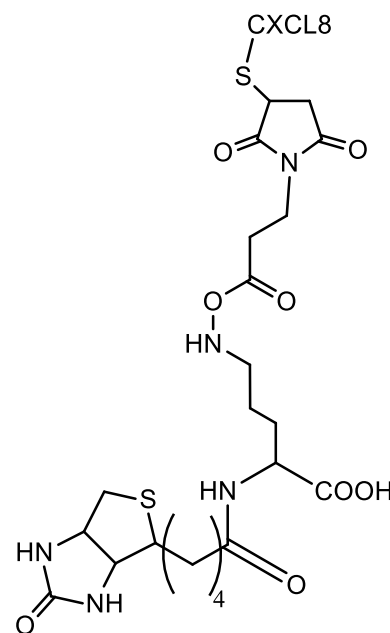
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; 300K; TMS):  $\delta_H$  (in ppm) = 7.12 (d, 2 H, ArH(2)), 6.70 (d, 2 H, ArH(1)), 2.98 (t, 6.45 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>(3)), 2.83 (t, 6.40 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>(4)), 1.11 (d, 5.78 Hz, 18 H, CH<sub>3</sub>(5)), 1.05 (q, 5.71 Hz, 3 H, CH(6)).

---

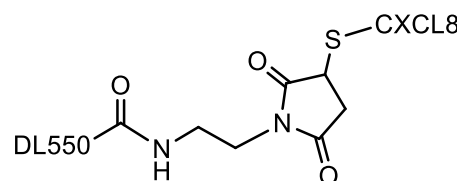
### 6.4.5. Proteinkonjugation

---

**CXCL8-Biotin Konjugat 4:** Um das C-terminale Cystein des CXCL8-S72C **2** für eine Konjugation zugänglich zu machen, muss zunächst die intermolekulare Disulfidbrücke möglicher kovalent verknüpfter IL8-Dimere reduziert werden. Dazu werden 100  $\mu\text{L}$  TCEP Harz (0.8  $\mu\text{mol}$ , 6.4 äq) dreimal mit 300  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer gewaschen, der 20 mM EDTA enthält, und einmal mit 300  $\mu\text{L}$  Puffer C. Nun wird 500  $\mu\text{L}$  einer 2 mg/mL Lösung IL8Cys **2** (0.125  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) auf das Harz gegeben und für 60 min bei RT auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 1500 g wird der Überstand auf 50  $\mu\text{L}$  einer 10 mg/mL Lösung von N-(3-Maleimidopropionyl)biocytin (0.96  $\mu\text{mol}$ , 7.6 äq) in DMF gegeben. Das Harz wird noch einmal mit 200  $\mu\text{L}$  Puffer C gewaschen und der Überstand ebenfalls zur Reaktionslösung pipettiert. Die Lösung wird 2 h bei 600 rpm geschüttelt und das Produkt anschließend durch RP-HPLC isoliert. Es wird eine semipräparative RP8 Säule verwendet und ein linearer Gradient von 0-80% Eluent B in Eluent A über 6 CV gewählt. Das Eluat wird lyophilisiert und über ESI-MS analysiert. Es wird 1 mg eines weißen, Watte-ähnlichen Feststoffs erhalten (0.112  $\mu\text{mol}$ , 90 % Ausbeute). ESI-MS m/z (%): 1846.41 (5)  $[\text{M}+5\text{H}]^{+5}$ , 1538.84 (10)  $[\text{M}+6\text{H}]^{+6}$ , 1319.15 (15)  $[\text{M}+7\text{H}]^{+7}$ , 1154.38 (100)  $[\text{M}+8\text{H}]^{+8}$ , 1026.22 (15)  $[\text{M}+9\text{H}]^{+9}$ . Erwartete Masse: 9227 g/mol. Gemessene Masse: 9227 g/mol.



**CXCL8-DL550 Konjugat 3:** Um das C-terminale Cystein des CXCL8-S72C **2** für eine Konjugation zugänglich zu machen, wird verfahren wie oben beschrieben. 100  $\mu\text{L}$  der reduzierten CXCL8-S72C-Lösung **2** (50 nmol, 1 äq) werden zu 10  $\mu\text{L}$  einer 10 mg/mL Lösung DyLight550-maleimid (94 nmol, 1.88 äq) in DMF gegeben. Die Lösung wird 2 h bei 600 rpm geschüttelt und das Produkt anschließend durch RP-HPLC isoliert. Es wird eine semipräparative RP8 Säule verwendet und ein linearer Gradient von 0-80% Eluent B in Eluent A über 6 CV gewählt. Das Eluat wird lyophilisiert und über ESI-MS analysiert. Es wird 0.1 mg eines hell-gelblichen Feststoffs erhalten (11 nmol, 21 % Ausbeute). ESI-MS m/z (%): 1880.08 (60)  $[\text{M}+5\text{H}]^{+5}$ , 1566.90 (35)  $[\text{M}+6\text{H}]^{+6}$ , 1343.20 (100),  $[\text{M}+7\text{H}]^{+7}$ . Erwartete Masse: 9397 g/mol. Gemessene Masse: 9396 g/mol.



---

## 6.5. Peptomersynthese

---

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit funktionalisierten Partikel und Harze, sowie alle synthetisierten Peptid- und Peptoid-Oligomere aufgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle kommerziell erhältlichen Chemikalien bei den in Absatz 6.1 aufgeführten Firmen erstanden. Weitere Details zu den verwendeten Puffern und Syntheseharzen sind in Absatz 6.1.1 und Absatz 6.1.3 zu finden.

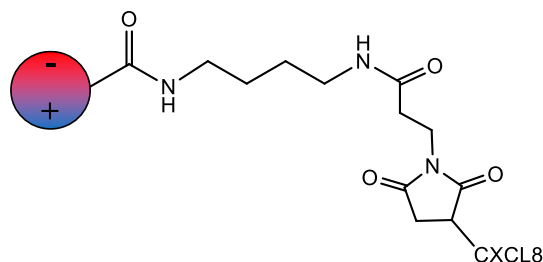
---

### 6.5.1. Partikelfunktionalisierung

---

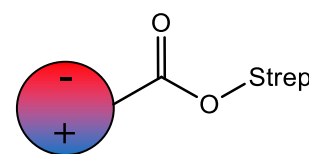


**M-PVA-C22-MIP-IL8 34:** Eine Suspension von M-PVA-C22-Magnetpartikeln (Chemagen) wird unter starkem Schütteln homogenisiert und 0.5 mL davon (10  $\mu$ mol, 1 äq) in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Das Reaktionsgefäß wird in einen Magnetseparator platziert und der Überstand nach 1 min abgenommen. Die Partikel werden dreimal mit je 2 mL Kupplungspuffer gewaschen und



im Anschluss daran 5 min damit bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und die Partikel werden in 2 mL 0.03 M EDC\*HCl und 0.03 M NHS in Kupplungspuffer resuspendiert und für 15 min bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. N-Boc-Diaminobutan **45** wird in DMSO gelöst und daraus eine 11 mg/mL Lösung in Kupplungspuffer hergestellt. 1 mL dieser Lösung (60  $\mu$ mol, 6.0 äq) wird zu der Partikelsuspension gegeben und für mindestens 3 h bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Partikel dreimal mit je 2 mL Kupplungspuffer und dreimal mit je 2 mL Blockpuffer gewaschen und für eine Stunde in Blockpuffer bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Partikel werden nun je dreimal mit 2 mL Waschpuffer, 2 mL DMF und 2 mL DCM gewaschen. Die Boc-Schutzgruppe wird nach AAV12 entfernt und die Partikel anschließend je dreimal mit 2 mL DCM und DMF gewaschen. 16.0 mg (60  $\mu$ mol, 6 äq) 3-Maleimidopropionsäure-NHS Ester **80** werden in 2 mL DMF gelöst und zur Suspension gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für mindestens 4 h bei RT und 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert und anschließend nach AAV6 mit DMF und schließlich mit Puffer C gewaschen und in 2 mL Puffer C gelagert. 100  $\mu$ L TCEP Harz (0.8  $\mu$ mol, 6.4 äq) wird dreimal mit 300  $\mu$ L PBS gewaschen, der 20 mM EDTA enthält, und einmal mit 300  $\mu$ L Puffer C. Nun werden 500  $\mu$ L einer 2 mg/mL Lösung IL8Cys **2** (0.125  $\mu$ mol, 1 äq) auf das Harz gegeben und für 60 min bei RT auf dem Schüttler bei 600 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 1500 g wird der Überstand zu 25  $\mu$ L (0.125  $\mu$ mol, 1 äq) der Magnetpartikelsuspension pipettiert. Das TCEP-Harz wird noch einmal mit 200  $\mu$ L Puffer C gewaschen und der Überstand ebenfalls zur Magnetpartikelsuspension pipettiert. Die Lösung wird 2 h bei 600 rpm geschüttelt. Der Erfolg der Anbindung wird qualitativ, durch Inkubation eines kleinen Teils der Partikel mit FITC-anti-human-IL8 Antikörper und anschließendes Messen der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm im Mikrotiterplattenleser bestimmt.

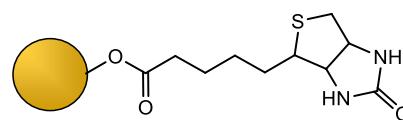
**M-PVA-C22-Streptavidin 35:** Eine Suspension von M-PVA-C22-Magnetpartikeln (Chemagen) wird unter starkem Schütteln homogenisiert und 0.5 mL davon (10  $\mu$ mol, 1 äq) in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Das Reaktionsgefäß wird in einen Magnetseparator platziert und der Überstand nach 1 min abgenommen.



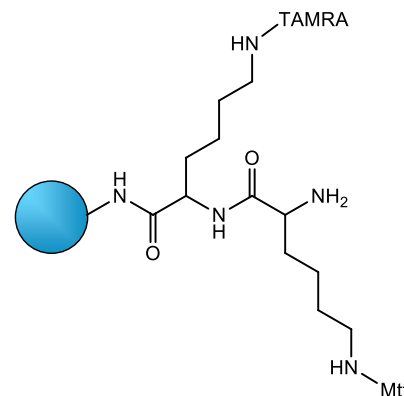
Die Partikel werden dreimal mit je 2 mL Kupplungspuffer gewaschen und im Anschluss daran 5 min damit bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Der Überstand wird abgenommen, und die Partikel werden in 2 mL 0.03 M EDC\*HCl und 0.03 M NHS in Kupplungspuffer resuspendiert und für 15 min bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. 1 mL einer 2 mg/mL (60 nmol, 0.015 äq) Streptavidin-Lösung in Kupplungspuffer wird zugegeben und für mindestens 3 h bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Partikel dreimal mit je 2 mL Kupplungspuffer und dreimal mit je 2 mL Blockpuffer gewaschen und für eine Stunde in Blockpuffer bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Partikel werden nun dreimal mit je 2 mL Waschpuffer gewaschen und können bei 4 °C in Waschpuffer gelagert werden. Die Anbindung von Streptavidin wird qualitativ durch Inkubation eines kleinen Teils der Partikel mit einer 0.01 mg/mL Biotin-

Fluorescein<sup>43</sup> für 30 min auf dem Schüttler bei 600 rpm gezeigt. Die Partikel werden gewaschen und anschließend auf Fluoreszenz am Mikroskop untersucht. Um ein Ausbleichen des Fluorophors während der Messungen auszuschließen, wurden alle Arbeitsschritte in einem verdunkelten Raum ohne direktes Licht durchgeführt und die Belichtungszeit des Partikel unter dem Mikroskop so kurz wie möglich gehalten. Die Auswertung der Bilder erfolgte im Anschluss mit ImageJ.

**TentaGel MB HMBA-Biotin 33:** 100 mg (24  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel MB HMBA Harz in einer 5 mL Spritze mit Filterfritte wird nach AAV0 in DCM gequollen und das Lösemittel abgelassen. Eine Lösung von 24.5 mg (72  $\mu$ mol, 3 äq) Biotin-NHS **81** in 1 mL DMF wird dem Harz zugegeben und mindestens 3 h bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wird das Harz nach AAV6 gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil der Partikel wird abgenommen nach AAV0 in DCM gequollen und nach AAV6 gewaschen. Dieser Teil des Harzes wird nun dreimal mit Puffer C gewaschen und eine Stunde darin bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Um einen qualitativen Nachweis der Biotin-Anbindung zu erhalten wird 100  $\mu$ L einer 1  $\mu$ g/mL Lösung Streptavidin-DL550 in Puffer C auf das Harz gegeben und eine Stunde bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Das Harz wird 10-mal mit Puffer C gewaschen und unter dem Mikroskop auf Fluoreszenz im RHO-Kanal (538-562 nm) untersucht.



**RAM-K(TAMRA)K(Mtt)-OH 83:** 1.8 g (1.062 mmol, 1 äq) Fmoc-RAM-Harz wird nach AAV0 in einer 30 mL Spritze mit Filterfritte gequollen und die Fmoc-Schutzgruppe nach AAV8 entfernt. Nach AAV5a wird Fmoc-Lys(Mtt) als erste Aminosäure angebracht und die Seitenkette nach AAV10 entschützt. 5(6)-Carboxy-TAMRA wird nach AAV5a an das Amin der freien Seitenkette gekuppelt und die Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus wird nach AAV8 entfernt. Fmoc-Lys(Mtt)-OH wird nach AAV5a an den N-Terminus gekuppelt und eine Entschützung nach AAV8 durchgeführt. Im Anschluss daran wird das Harz nach AAV6 gewaschen und getrocknet.



## 6.5.2. Festphasen-Peptid- und Peptoidsynthese

Alle Peptide wurden, wenn nicht anders angegeben, nach einem Standard-Fmoc-Festphasenpeptidsynthese-Protokoll synthetisiert, und die verwendeten Aminosäuren waren am N-Terminus Fmoc-geschützt.<sup>[463]</sup> Die Peptoidsynthese erfolgte nach der Submonomermethode nach Zuckermann *et al.*<sup>[271],[276]</sup>

<sup>43</sup> Hergestellt und zur Verfügung gestellt von Dr. Ina Rink, AK Schmitz, TU Darmstadt.



*NH<sub>2</sub>-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ-COOH*, *IL8RPLoopsQ* **5**:<sup>[227]</sup> Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 100 mg (3.0  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel S AC Harz wird nach AAV0 gequollen und die Kupplung der Aminosäuren mit jeweils 3 äq. Aminosäure, 5 äq. DIC und 5 äq. Oxyma nach AAV14 durchgeführt. Das Peptid wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptids erfolgt durch RP-HPLC (6 CV linearer Gradient von 0-80% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 33 min. ESI-MS, m/z (%): 551.7 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 735.3 (50) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1102.4 (8) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2203 g/mol. Gemessene Masse: 2203 g/mol.

*Fluo-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQ-COOH*, *Fluo-IL8RPLoopsQ* **8**:<sup>[227]</sup> Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 100 mg (3.0  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel S AC Harz wird nach AAV0 gequollen und die Kupplung von jeweils 3 äq Aminosäuren mit 5 äq DIC und 5 äq Oxyma nach AAV14 durchgeführt. Das Peptid wird nach AAV5b mit FAM markiert und anschließend nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptids erfolgt durch RP-HPLC (6 CV linearer Gradient von 0-80% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 56 min. ESI-MS, m/z (%): 513.2 (15) [M+5H]<sup>5+</sup>, 641.2 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 854.7 (45) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1281.5 (5) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2561 g/mol. Gemessene Masse: 2561 g/mol.

*Fluo-AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTE-COOH*, *Fluo-IL8RPLoopsE* **7**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 100 mg (3.0  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel S AC Harz wird nach AAV0 gequollen und die Kupplung der Aminosäuren mit jeweils 3 äq. Aminosäure, 5 äq. DIC und 5 äq. Oxyma nach AAV14 durchgeführt. Das Peptid wird nach AAV5b mit FAM markiert und anschließend nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptids erfolgt durch RP-HPLC (6 CV linearer Gradient von 0-80% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 54 min. ESI-MS, m/z (%): 641.5 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 854.9 (30) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1281.9 (5) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2562 g/mol. Gemessene Masse: 2562 g/mol.

*Fluo-AKWRMVLRI-Ahx-ADTL-NMet<sup>+0</sup>-RTE-COOH*, *Fluo-IL8RPLoops-15NMet* **14**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 50 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a bis zum Einbau des Peptoidbausteins fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit NMet<sup>+0</sup> **46** durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV 20% Eluent B, 5 CV linearer Gradient von 20-80% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.9 min und 29.2 min. ESI-MS, m/z (%): 641.5 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 854.9 (30) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1281.9 (5) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2562 g/mol. Gemessene Masse: 2562 g/mol.

*Fluo-AKWRMVLRI-Ahx-ADT-NLeu<sup>+0</sup>-LMRTE-COOH*, *Fluo-IL8RPLoops-14NLeu* **13**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 50 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a bis zum Einbau des Peptoidbausteins fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>) durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV 20% Eluent B, 5 CV linearer Gradient von 20-80% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.9 min und 29.2 min. ESI-MS, m/z (%): 641.5 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 854.9 (30) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1281.9 (5) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2562 g/mol. Gemessene Masse: 2562 g/mol.

*Fluo-AKWRMVLRI-Ahx-NAla<sup>+0</sup>-DTLMRTE-COOH*, *Fluo-IL8RPLoops-11NAla* **12**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 50 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a bis zum Einbau des Peptoidbausteins fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit Methylamin (NAla<sup>+0</sup>) durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV 20% Eluent B, 5 CV linearer Gradient von 20-80% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.9 min und 29.2 min. ESI-MS, m/z (%): 641.5 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 854.9 (30) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1281.9 (5) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2562 g/mol. Gemessene Masse: 2562 g/mol.

*Fluo-AKWRMV-NLeu<sup>+0</sup>-RI-Ahx-ADTLMRTE-COOH*, *Fluo-IL8RPLoops-7NLeu* **11**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 50 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a bis zum Einbau des Peptoidbausteins fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit Isobutylamin (N-Leu<sup>+0</sup>) durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV 20% Eluent B, 5 CV linearer Gradient von 20-80% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.9 min und 29.2 min. ESI-MS, m/z (%): 641.5 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 854.9 (30) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1281.9 (5) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2562 g/mol. Gemessene Masse: 2562 g/mol.

*Fluo-AKWR-NMet<sup>+0</sup>-VLRI-Ahx-ADTLMRTE-COOH*, *Fluo-IL8RPLoops-5NMet* **10**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 50 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach

---

AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a bis zum Einbau des Peptoidbausteins fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit N-Met<sup>+0</sup> **46** durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15(1 CV 20% Eluent B, 5 CV linearer Gradient von 20-80% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.9 min und 29.2 min. ESI-MS, m/z (%): 641.5 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 854.9 (30) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1281.9 (5) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2562 g/mol. Gemessene Masse: 2562 g/mol.

*Fluo-NAla<sup>+0</sup>-KWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTE-COOH, Fluo-IL8RPLoops-1NAla* **9**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 50 mg 2-Chlorotritylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a bis zum Einbau des Peptoidbausteins fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit Methylamin (N-Ala<sup>+0</sup>) durchgeführt. Daraufhin wird nach AAV5b mit FAM markiert und das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15(1 CV 20% Eluent B, 5 CV linearer Gradient von 20-80% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.9 min und 29.2 min. ESI-MS, m/z (%): 641.5 (100) [M+4H]<sup>4+</sup>, 854.9 (30) [M+3H]<sup>3+</sup>, 1281.9 (5) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 2562 g/mol. Gemessene Masse: 2562 g/mol.

$\text{AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTQKK(TAMRA)-CONH}_2$  , *IL8RPCycloopsQ* **25**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 500 mg (185  $\mu$ mol, 1 äq) AmphiSpheres 40 RAM-Harz wird nach AAV0 gequollen. Als erste Aminosäure wird nach AAV5a Fmoc-Lys(Mtt) gekuppelt, welches daraufhin nach AAV10 an der Seitenkette entschützt wird. Die freie Lysin-Seitenkette wird nach AAV5a mit 5(6)Carboxy-TAMRA **24** markiert und im Anschluss daran der N-Terminus der Peptidkette nach AAV8 entschützt. Es folgen ein Kupplungsschritt nach AAV5a mit Fmoc-Lys(Alloc) und die Entschützung nach AAV8. Anschließend wird eine Kupplung mit Fmoc-Gln-OH nach AAV5a und ein Entschützen nach AAV8 durchgeführt, und die weitere Synthese des Peptids wird am Synthesizer nach AAV14 vorgenommen. Zur Zyklisierung des Peptids nach einer abgewandelten Vorschrift von Chandra *et. al.*<sup>[358]</sup> wird zunächst eine weitere Kupplung nach AAV5a mit 3 äq Bernsteinsäure durchgeführt um das Succinimid zu generieren. Im Anschluss daran wird die Alloc-Schutzgruppe nach AAV11 abgespalten und 1 % TFA/ 2.5% TIPS in DCM auf das Harz gegeben. Die Zyklisierung erfolgt über Nacht bei RT und 600 rpm auf dem Schüttler. Der Erfolg der Zyklisierung wird durch einen negativen Chloraniltest (AAV9) bestätigt. Das Peptid wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptids erfolgte durch RP-HPLC (1 CV 0 % Eluent B, 5 CV linearer Gradient von 0-75 % Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 29.5 min und 29.8 min. ESI-MS, m/z (%): 984,27 (100)  $[M+3H]^+3$ . Berechnete Masse: 2950.56 g/mol. Gemessene Masse: 2949.81 g/mol

$\text{AKWRMVLRI-Ahx-ADTLMRTEKK(TAMRA)-CONH}_2$  , *IL8RPCycloopsE* **26**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 500 mg (185  $\mu$ mol, 1 äq) AmphiSpheres 40 RAM-Harz wird nach AAV0 gequollen. Als erste Aminosäure wird nach AAV5a Fmoc-Lys(Mtt) gekuppelt, welches daraufhin nach AAV10 an der Seitenkette entschützt wird. Die freie Lysin-Seitenkette wird nach AAV5a mit 5(6)Carboxy-TAMRA **24** markiert und im Anschluss daran der N-Terminus der Peptidkette nach AAV8 entschützt. Es folgen ein Kupplungsschritt nach AAV5a mit Fmoc-Lys(Alloc) und die Entschützung nach AAV8. Anschließend wird eine Kupplung mit Fmoc-Glu(OtBu)-OH nach AAV5a und ein Entschützen nach AAV8 durchgeführt, und die weitere Synthese des Peptids wird am Synthesizer nach AAV14 vorgenommen. Zur Zyklisierung des Peptids nach einer abgewandelten Vorschrift von Chandra *et. al.*<sup>[358]</sup> wird zunächst eine weitere Kupplung nach AAV5a mit 3 äq Bernsteinsäure durchgeführt das Succinimid zu generieren. Im Anschluss daran wird die Alloc-Schutzgruppe nach AAV11 abgespalten und 1 % TFA/ 2.5% TIPS in DCM auf das Harz gegeben. Die Zyklisierung erfolgt über Nacht bei RT und 600 rpm auf dem Schüttler. Der Erfolg der Zyklisierung wird durch einen negativen Chloraniltest (AAV9) bestätigt. Das Peptid wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptids erfolgte durch RP-HPLC (1 CV 0 % Eluent B, 5 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 29.7 min und 30.0 min. ESI-MS, m/z (%): 984,60 (100)  $[M+3H]^+3$ . Berechnete Masse: 2951.54 g/mol. Gemessene Masse: 2950.80 g/mol.

*Fluo-MWDFDD-Ahx-MPPADEDYSP-COOH*, *Fluo-CXCR1-p1* **16**:<sup>[451]44</sup> Die Synthese wurde von K. Schmitz und P. Wadhwani am Peptid Synthesizer (Syro II multiple peptide synthesizer, Institute of Biological Interfaces 2, KIT, Karlsruhe) durchgeführt. Die Reinigung des Peptids erfolgte auf einem ÄKTA purifier HPLC System (RP18, 10 min 10 % Eluent B + 0,025% NH<sub>3</sub>, linearer Gradient 10-75 min Eluent B + 0,025% NH<sub>3</sub> bis 80 %). Die Retentionszeit des Produktes liegt bei 45 min.

*Fluo-MWDFDD-Ahx-MPPADED-NTyr<sup>+1</sup>-SP-COOH*, *Fluo-Att15NTyr* **23**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 100 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Durchführen der Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a und des Entschützungs-schrittes nach AAV8, bis zum Einbau des Peptoidbausteins, fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit Tyramin (N-Tyr<sup>+1</sup>) **51** durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt in zwei Schritten durch RP-HPLC (1.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B + 0.025% NH<sub>3</sub>, das Produkt eluiert bei einer Retentionszeit von 10 min, 2.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B, 5 CV Gradient von 20-85% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 40.4 min. ESI-MS, m/z (%): 1206.90 (100) [M-2H]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 2416 g/mol. Gemessene Masse: 2416 g/mol.

*Fluo-MWDFDD-Ahx-MPPADE-NAsp<sup>+0</sup>-YSP-COOH*, *Fluo-Att14NAsp* **22**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH. 100 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Durchführen der Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a und des Entschützungs-schrittes nach AAV8, bis zum Einbau des Peptoidbausteins, fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit Glycin(OtBu) (N-Asp<sup>+0</sup>) durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt in zwei Schritten durch RP-HPLC (1.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B + 0.025% NH<sub>3</sub>, das Produkt eluiert bei einer Retentionszeit von 10 min, 2.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B, 5 CV Gradient von 20-85% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 40.4 min. ESI-MS, m/z (%): 1199.93 (100) [M-2H]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 2402 g/mol. Gemessene Masse: 2402 g/mol.

<sup>44</sup> Synthetisiert von K. Schmitz und P. Wadhwani (Syro II multiple peptide synthesizer, Institute of Biological Interfaces 2, KIT, Karlsruhe)



*Fluo-MWDFDD-Ahx-MPPAD-NGlu<sup>+0</sup>-DYSP-COOH*, *Fluo-Att13NGlu* **21**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH. 100 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Durchführen der Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a und des Entschützungs-schrittes nach AAV8, bis zum Einbau des Peptoidbausteins, fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit  $\beta$ -Alanin(OtBu) (N-Glu<sup>+0</sup>) durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt in zwei Schritten durch RP-HPLC (1.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B + 0.025% NH<sub>3</sub>, das Produkt eluiert bei einer Retentionszeit von 10 min, 2.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B, 5 CV Gradient von 20-85% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 40.4 min. ESI-MS, m/z (%): 1199.93 (100) [M-2H]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 2402 g/mol. Gemessene Masse: 2402 g/mol.

*Fluo-MWDFDD-Ahx-MPPA-NAsp<sup>+0</sup>-EDYSP-COOH*, *Fluo-Att12NAsp* **20**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH. 100 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Durchführen der Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a und des Entschützungs-schrittes nach AAV8, bis zum Einbau des Peptoidbausteins, fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit Glycin(OtBu) (N-Asp<sup>+0</sup>) durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt in zwei Schritten durch RP-HPLC (1.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B + 0.025% NH<sub>3</sub>, das Produkt eluiert bei einer Retentionszeit von 10 min, 2.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B, 5 CV Gradient von 20-85% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 40.4 min. ESI-MS, m/z (%): 1199.93 (100) [M-2H]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 2402 g/mol. Gemessene Masse: 2402 g/mol.

*Fluo-MWDFDD-Ahx-MPP-NAla<sup>+0</sup>-DEDYSP-COOH*, *Fluo-Att11NAla* **19**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH. 100 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Durchführen der Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a und des Entschützungs-schrittes nach AAV8, bis zum Einbau des Peptoidbausteins, fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit Methylamin (N-Ala<sup>+0</sup>) durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt in zwei Schritten durch RP-HPLC (1.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B + 0.025% NH<sub>3</sub>, das Produkt eluiert bei einer Retentionszeit von 10 min, 2.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B, 5 CV Gradient von 20-85% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 40.4 min. ESI-MS, m/z (%): 1199.93 (100) [M-2H]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 2402 g/mol. Gemessene Masse: 2402 g/mol.

*Fluo-MWDFDD-Ahx--NMet<sup>+0</sup>-PPADEDYSP-COOH*, *Fluo-Att8NMet* **18**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH. 100 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Durchführen der Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a und des Entschützungs-schrittes nach AAV8, bis zum Einbau des Peptoidbausteins, fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit N-Met<sup>+0</sup> **46** durchgeführt. Daraufhin wird die Sequenz weiter wie oben beschrieben synthetisiert und anschließend nach AAV5b mit FAM markiert. Das Peptomer wird nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt in zwei Schritten durch RP-HPLC (1.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B + 0.025% NH<sub>3</sub>, das Produkt eluiert bei einer Retentionszeit von 10 min, 2.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B, 5 CV Gradient von 20-85% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 40.4 min. ESI-MS, m/z (%): 1199.93 (100) [M-2H]<sup>-2</sup> Berechnete Masse: 2402 g/mol. Gemessene Masse: 2402 g/mol.

*Fluo-NMet<sup>+0</sup>-WDFDD-Ahx-MPPADEDYSP-COOH*, *Fluo-Att1NMet* **17**: Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH. 100 mg 2-Chlorotriylchlorid Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure nach AAV2 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Durchführen der Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a und des Entschützungs-schrittes nach AAV8, bis zum Einbau des Peptoidbausteins, fortgeführt. Der Einbau des Peptoidbausteins wird durch Acylierung des Kettenendes nach AAV3 mit Bromessigsäure und anschließendes Aminieren nach AAV4 mit N-Met<sup>+0</sup> **46** durchgeführt. Daraufhin wird nach AAV5b mit FAM markiert und das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt in zwei Schritten durch RP-HPLC (1.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B + 0.025% NH<sub>3</sub>, das Produkt eluiert bei einer Retentionszeit von 10 min, 2.: 2 CV isokratisch 20% Eluent B, 5 CV Gradient von 20-85% Eluent B), die Retentionszeit des Produktes liegt bei 40.4 min. ESI-MS, m/z (%): 1199.93 (100) [M-2H]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 2402 g/mol. Gemessene Masse: 2402 g/mol.

*NH<sub>2</sub>-DVEAWLDERVPLVET-TentaGel MB HMBA*, *StrepBP1* **27**:<sup>[394],[464]</sup> Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH,. 100 mg (2.3 µmol, 1 äq) TentaGel MB HMBA Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure wird nach AAV1 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a fortgeführt. Anschließend wird das Peptid nach AAV12 entschützt und das Harz nach AAV0 gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil des Harzes wird abgenommen und davon das Peptid nach AAV13 für eine ESI-MS Analyse abgespalten. ESI-MS, m/z (%): 1769.09 (30) [M+H]<sup>+</sup>, 885.07 (100) [M+2H]<sup>+2</sup>, 590.36 (60), [M+3H]<sup>+3</sup>. Berechnete Masse: 1768 g/mol. Gemessene Masse: 1768 g/mol.



*NH<sub>2</sub>-DVEAWLGER-TentaGel MB HMBA, StrepBP2* **28:** <sup>[394],[464]</sup> Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 100 mg (2.3  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel MB HMBA Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure wird nach AAV1 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a fortgeführt. Anschließend wird das Peptid nach AAV12 entschützt und das Harz nach AAV0 gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil des Harzes wird abgenommen und davon das Peptid nach AAV13 für eine ESI-MS Analyse abgespalten. ESI-MS, m/z (%): 1073.67 (38) [M+H]<sup>+</sup>, 537.55 (100) [M+2H]<sup>+2</sup>. Berechnete Masse: 1073 g/mol. Gemessene Masse: 1073 g/mol.

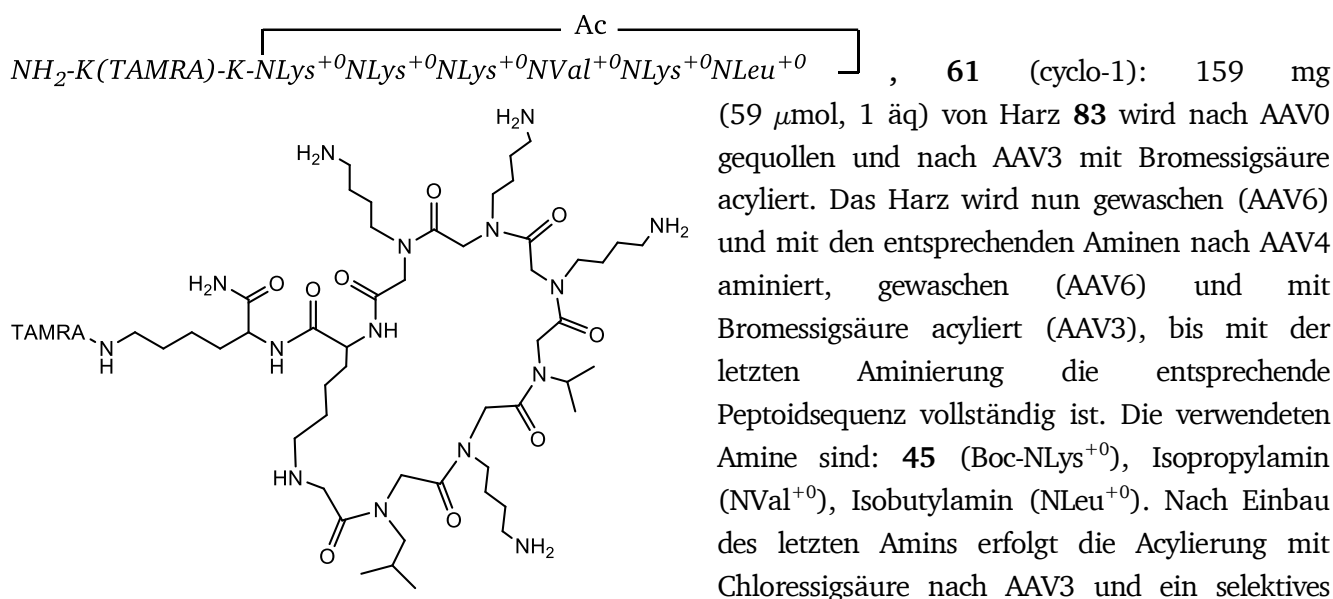
*NH<sub>2</sub>-DVEAWIADPAVHFTT-TentaGel MB HMBA, StrepBP3* **29:** <sup>[395]</sup> Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 100 mg (2.3  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel MB HMBA Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure wird nach AAV1 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a fortgeführt. Anschließend wird das Peptid nach AAV12 entschützt und das Harz nach AAV0 gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil des Harzes wird abgenommen und davon das Peptid nach AAV13 für eine ESI-MS Analyse abgespalten. ESI-MS, m/z (%): 1672.09 (25) [M+H]<sup>+</sup>, 836.45 (25) [M+2H]<sup>+2</sup>. Berechnete Masse: 1671 g/mol. Gemessene Masse: 1671 g/mol.

*NH<sub>2</sub>-DLYKVPSHCHPMMP-C-TentaGel MB HMBA, StrepBP4* **30:** <sup>[395]</sup> Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH. 100 mg (2.3  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel MB HMBA Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure wird nach AAV1 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a fortgeführt. Anschließend wird das Peptid nach AAV12 entschützt und das Harz nach AAV0 gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil des Harzes wird abgenommen und davon das Peptid nach AAV13 für eine ESI-MS Analyse abgespalten. ESI-MS, m/z (%): 1757.72 (1) [M+H]<sup>+</sup>, 879.36 (25) [M+2H]<sup>+2</sup>, 586.91 (50), [M+3H]<sup>+3</sup>. Berechnete Masse: 1757 g/mol. Gemessene Masse: 1757 g/mol.

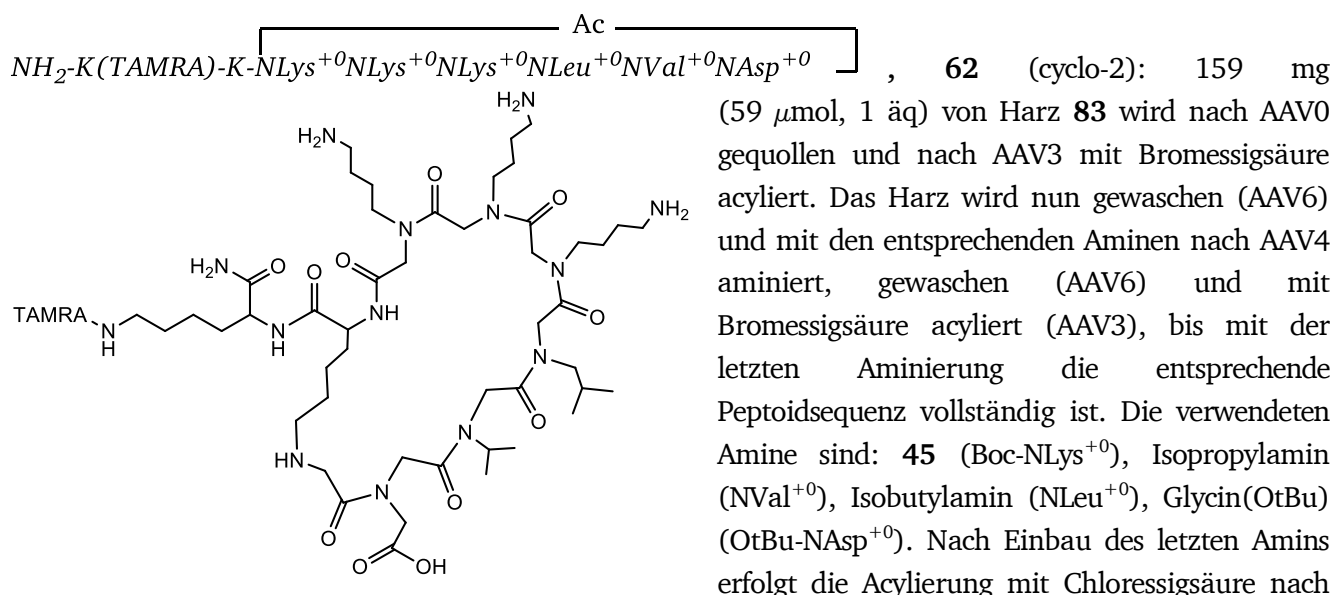
*NH<sub>2</sub>-AWRHPQFGG-TentaGel MB HMBA, StrepBP5* **31:** <sup>[396]</sup> Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH. 100 mg (2.3  $\mu$ mol, 1 äq) TentaGel MB HMBA Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure wird nach AAV1 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a fortgeführt. Anschließend wird das Peptid nach AAV12 entschützt und das Harz nach AAV0 gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil des Harzes wird abgenommen und davon das Peptid nach AAV13 für eine ESI-MS Analyse abgespalten. ESI-MS, m/z (%): 1054.67 (50) [M+H]<sup>+</sup>, 528.05 (100) [M+2H]<sup>+2</sup>. Berechnete Masse: 1055 g/mol. Gemessene Masse: 1055 g/mol

*NH<sub>2</sub>-HDHPQNL-TentaGel MB HMBA, StrepBP6* **32**.<sup>[448]</sup> Verwendete Aminosäuren mit Seitenkettenschutzgruppen: Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH. 100 mg (2.3 μmol, 1 äq) TentaGel MB HMBA Harz wird nach AAV0 gequollen und die erste Aminosäure wird nach AAV1 angebracht. Die Aminosäuresequenz wird durch alternierendes Entschützen nach AAV8 und Kupplung der nächsten Aminosäure in der Sequenz nach AAV5a fortgeführt. Anschließend wird das Peptid nach AAV12 entschützt und das Harz nach AAV0 gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil des Harzes wird abgenommen und davon das Peptid nach AAV13 für eine ESI-MS Analyse abgespalten. ESI-MS, m/z (%): 859.56 (30) [M+H]<sup>+</sup>, 430.35 (100) [M+2H]<sup>2+</sup>. Berechnete Masse: 859 g/mol. Gemessene Masse: 859 g/mol.

Die folgenden Peptoidsequenzen entsprechen Hits aus einer linearen Hexapeptoid OBOC-Bibliothek <sup>[1, 3, 397]</sup> und wurden in zyklisierter Form als Peptomere nachsynthetisiert:

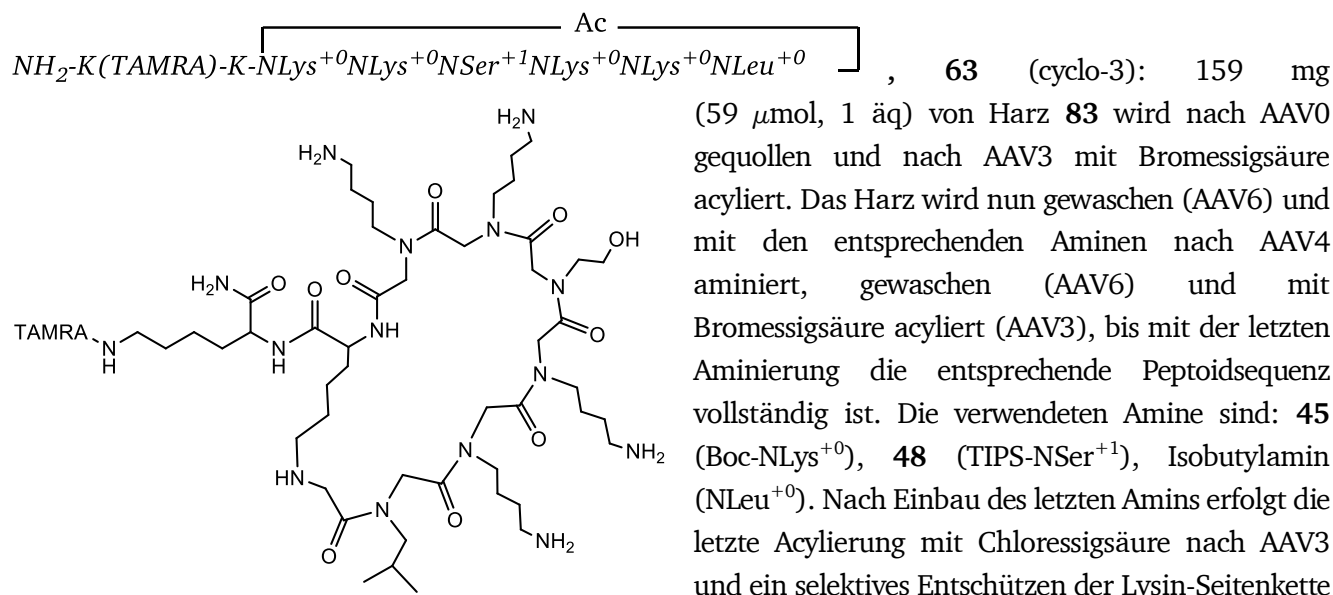


Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15(1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 27.8 min und 28.2 min. ESI-MS, m/z (%): 1038,21 (10) [M-1H-TAMRA]<sup>-</sup>. Berechnete Masse: 1449.88 g/mol. Gemessene Masse: 1039.21 g/mol.



(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isopropylamin (NVal<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>), Glycin(OtBu) (OtBu-NAsp<sup>+0</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach

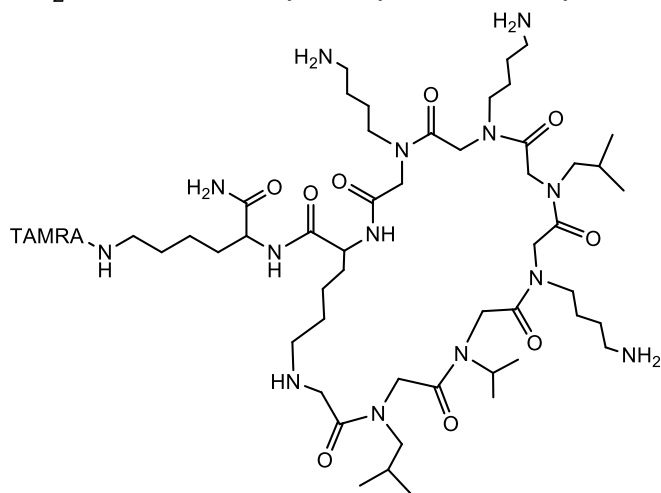
AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 27.8 min und 28.2 min. ESI-MS, m/z (%): 1025.26 (5) [M-1H-TAMRA]<sup>-</sup>. Berechnete Masse: 1436.81 g/mol. Gemessene Masse: 1026.26 g/mol.



(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), **48** (TIPS-NSer<sup>+1</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die letzte Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3

und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 29.0 min und 29.4 min. ESI-MS, m/z (%): 1038.29 (10) [M-1H-TAMRA]<sup>-</sup>. Berechnete Masse: 1451.85 g/mol. Gemessene Masse: 1039.29 g/mol.

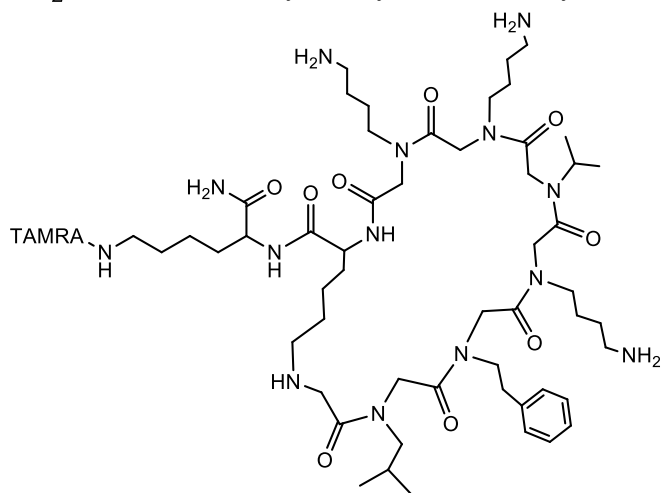
$NH_2$ -K(TAMRA)-K-NLys<sup>+0</sup>NLys<sup>+0</sup>NLeu<sup>+0</sup>NLys<sup>+0</sup>NVal<sup>+0</sup>NLeu<sup>+0</sup> Ac , **64** (cyclo-4): 159 mg



(59  $\mu$ mol, 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isopropylamin (NVal<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-

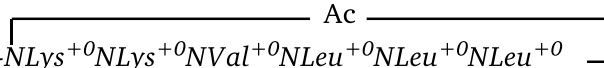
Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 27.8 min und 28.2 min. ESI-MS, m/z (%): 1438.68 (5) [M+H]<sup>+</sup>, 478.95 (50) [M+3H]<sup>+3</sup>. Berechnete Masse: 1436.87 g/mol. Gemessene Masse: 1437.68 g/mol.

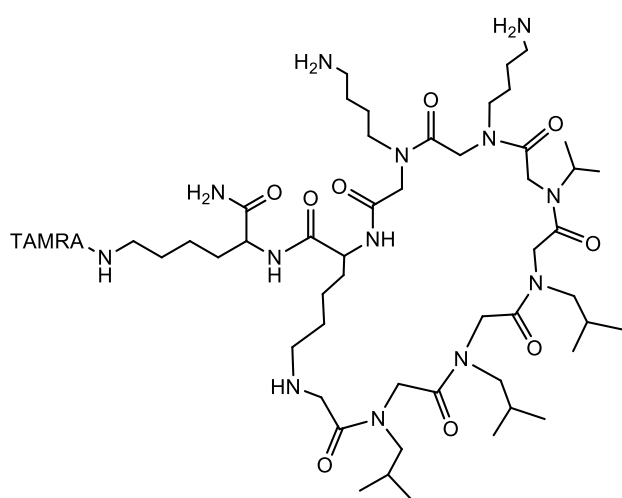
$NH_2$ -K(TAMRA)-K-NLys<sup>+0</sup>NLys<sup>+0</sup>NVal<sup>+0</sup>NLys<sup>+0</sup>NPhe<sup>+1</sup>NLeu<sup>+0</sup> Ac , **65** (cyclo-5): 159 mg



(59  $\mu$ mol, 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isopropylamin (NVal<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>), Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives

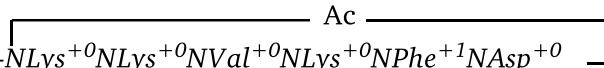
Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 27.6 min und 27.8 min. ESI-MS, m/z (%): 1069.34 (5) [M-1H-TAMRA]<sup>-</sup>. Berechnete Masse: 1482.86 g/mol. Gemessene Masse: 1070.34 g/mol.

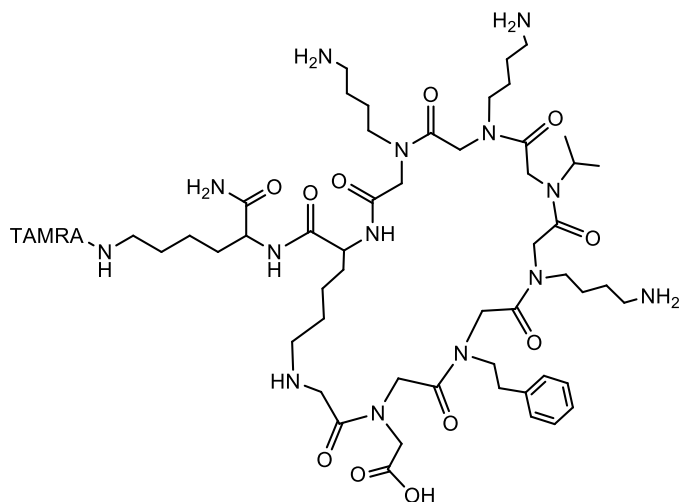
$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NLys}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NVal}^{+0}\text{NLeu}^{+0}\text{NLeu}^{+0}\text{NLeu}^{+0}$   , **66** (cyclo-6): 159 mg



(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3) bis die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isopropylamin (NVal<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF

bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.9 min und 29.3 min. ESI-MS, m/z (%): 1423,68 (5) [M-H]<sup>-</sup>, 1006.57 (100) [M-H-TAMRA]<sup>-</sup>. Berechnete Masse: 1419.87 g/mol. Gemessene Masse: 1007.57 g/mol.

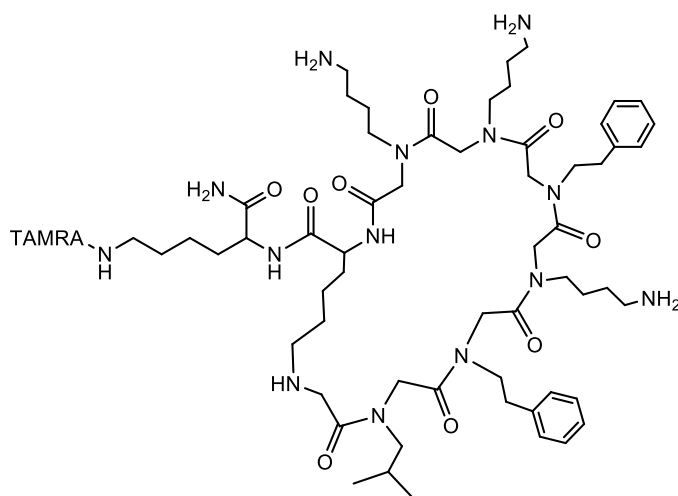
$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NLys}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NVal}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NPhe}^{+1}\text{NAsp}^{+0}$   , **67** (cyclo-7): 159 mg



(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isopropylamin (NVal<sup>+0</sup>), Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>), Glycin(OtBu) (OtBu-NAsp<sup>+0</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach

AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 29.7 min und 30.1 min. ESI-MS, m/z (%): 1073.87 (100) [+H-TAMRA]<sup>+</sup>, 546.75 (25) [M+2H-TAMRA]<sup>+2</sup>. Berechnete Masse: 1484.8 g/mol. Gemessene Masse: 1072.87 g/mol.

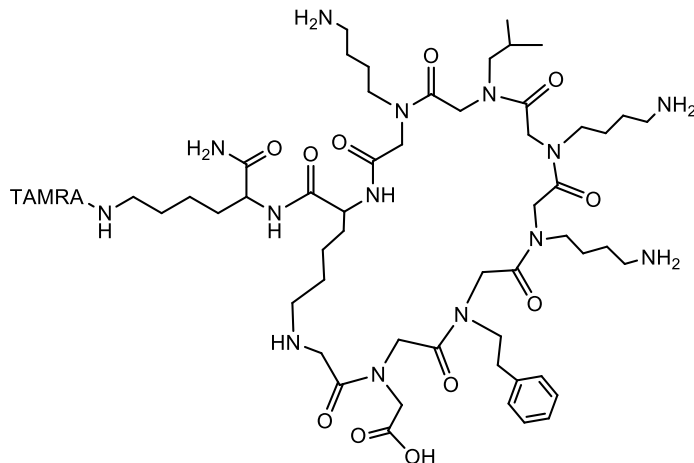
$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NLys}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NPhe}^{+1}\text{NLys}^{+0}\text{NPhe}^{+1}\text{NLeu}^{+0}$  Ac ], 68 (cyclo-8): 159 mg



(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3) bis die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>), Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach

AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.9 min und 29.3 min. ESI-MS, m/z (%): 1131.57 (100) [M-H-TAMRA]<sup>-</sup>. Berechnete Masse: 1544.86 g/mol. Gemessene Masse: 1132.57 g/mol.

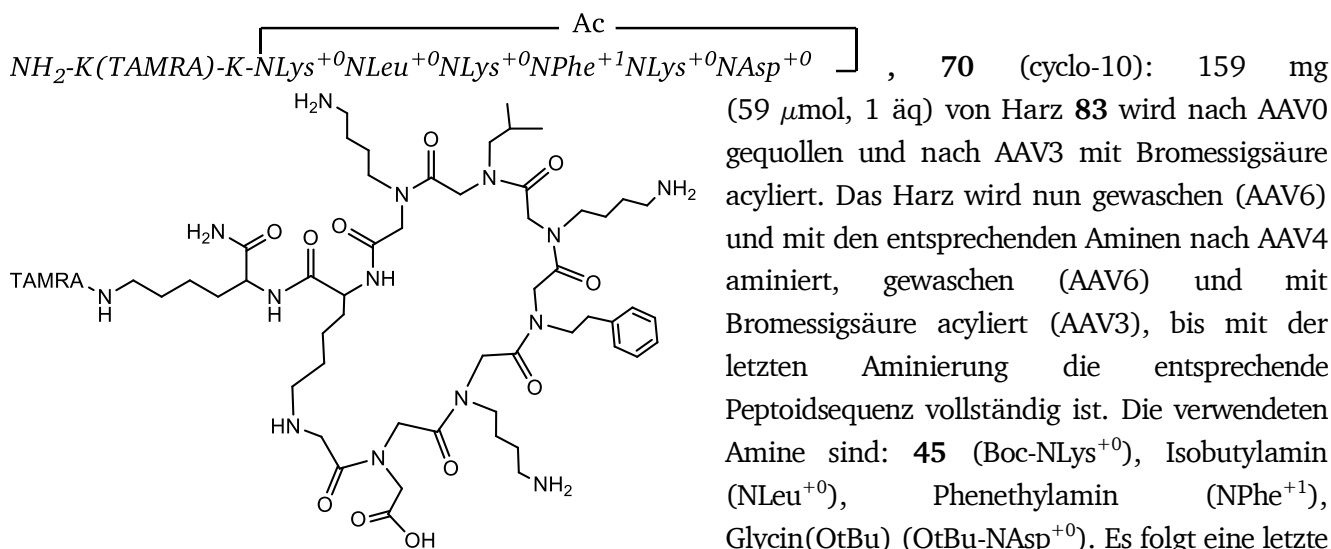
$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NLys}^{+0}\text{NLeu}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NPhe}^{+1}\text{NAsp}^{+0}$  Ac ], 69 (cyclo-9): 159 mg



(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>), Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>), Glycin(OtBu) (OtBu-NAsp<sup>+0</sup>). Es folgt eine letzte

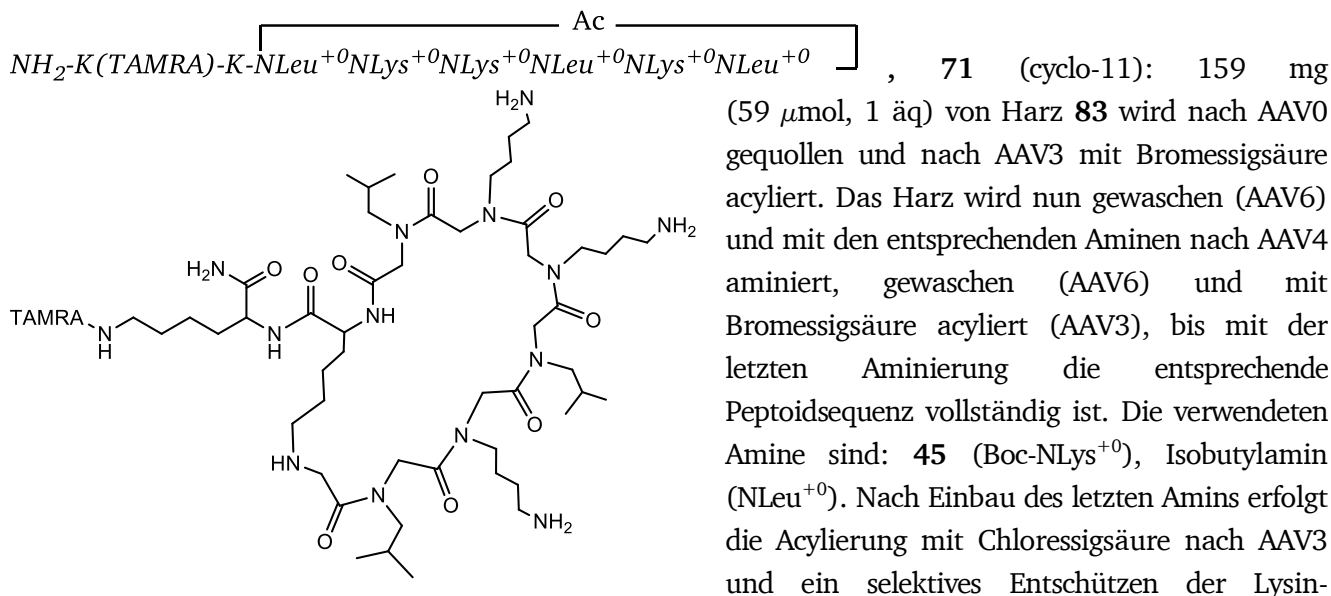
Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgte in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 31.4 min und 31.8 min. ESI-MS, m/z (%): 1087.17 (5) [M-H-TAMRA]<sup>-</sup>. Berechnete Masse: 1498.81 g/mol. Gemessene Masse: 1088.17 g/mol.





(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>), Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>), Glycin(OtBu) (OtBu-NAsp<sup>+0</sup>). Es folgt eine letzte

Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgte in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 31.4 min und 31.8 min. ESI-MS, m/z (%): 543.55 (10) [M-2H-TAMRA]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 1498.81 g/mol. Gemessene Masse: 1089.1 g/mol.

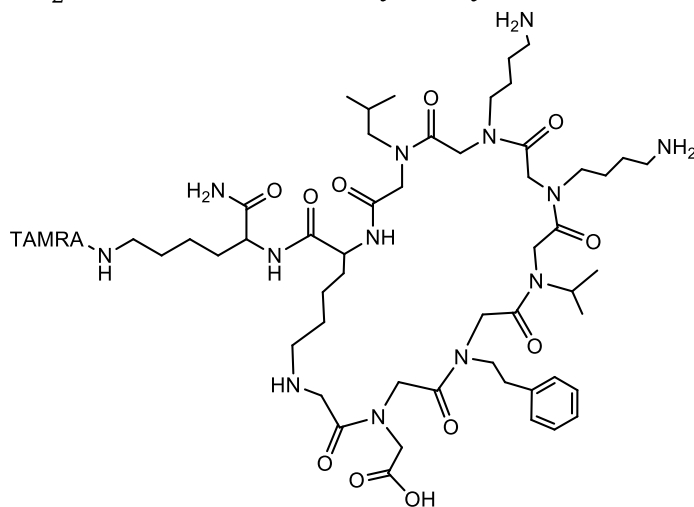


(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-

Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 31.4 min und 31.8 min. ESI-MS, m/z (%): 1039.75 (15) [M-H-TAMRA]<sup>-</sup>, 520.95 (90) [M-2H-TAMRA]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 1451.19 g/mol. Gemessene Masse: 1040.75 g/mol.



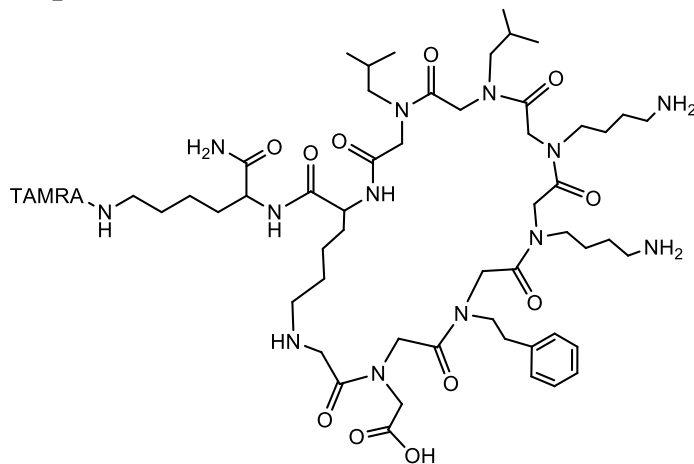
$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NLeu}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NVal}^{+0}\text{NPhe}^{+1}\text{NAsp}^{+0}$  , **72** (cyclo-12): 159 mg



(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>), Isopropylamin (NVal<sup>+0</sup>), Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>), Glycin(OtBu) (OtBu-NAsp<sup>+0</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt

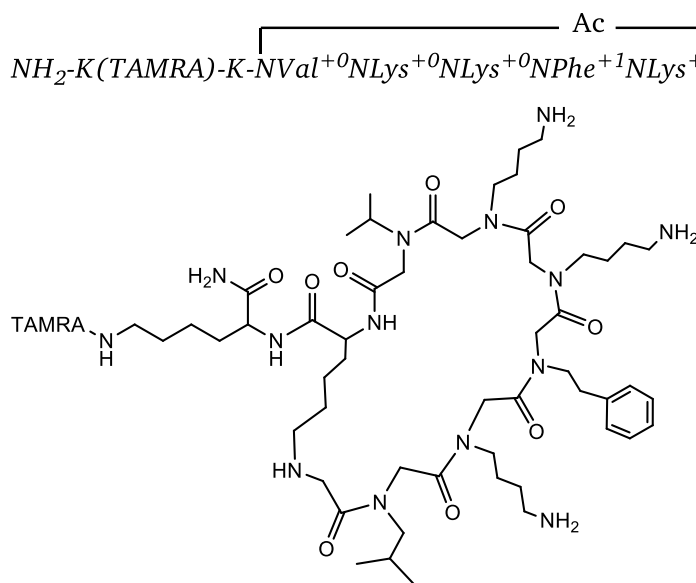
die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 31.4 min und 31.8 min. ESI-MS, m/z (%): 1058.87 (10) [M+H-TAMRA]<sup>+</sup>, 529.94 (35) [M+2H-TAMRA]<sup>+2</sup>. Berechnete Masse: 1469.79 g/mol. Gemessene Masse: 1057.87 g/mol.

$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NLeu}^{+0}\text{NLeu}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NPhe}^{+1}\text{NAsp}^{+0}$  , **73** (cyclo-13): 159 mg



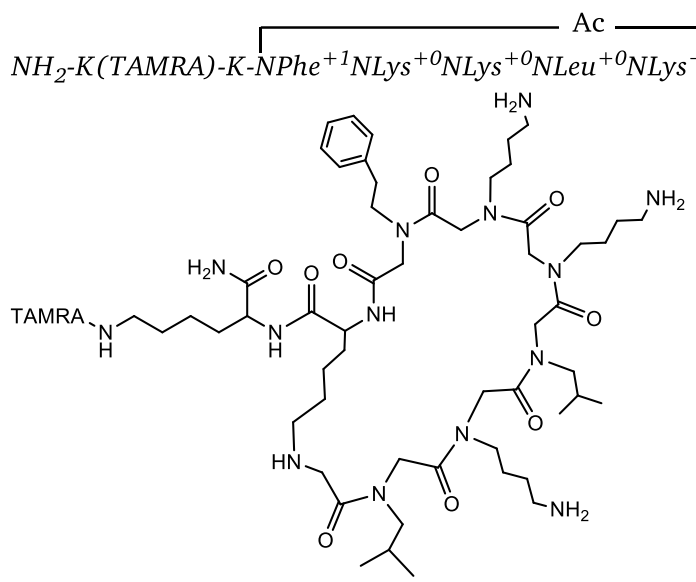
(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV 3) bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Isobutylamin (NLeu<sup>+0</sup>), Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>), Glycin(OtBu) (OtBu-NAsp<sup>+0</sup>). Nach Einbau des

letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 29.5 min und 30.1 min. ESI-MS, m/z (%): 1072.87 (10) [M+H-TAMRA]<sup>+</sup>, 537.25 (30) [M+2H-TAMRA]<sup>+2</sup>, 358.29 (100) [M+H-TAMRA]<sup>+3</sup>. Berechnete Masse: 1483.80 g/mol. Gemessene Masse: 1071.87 g/mol.

$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NVal}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NPhe}^{+1}\text{NLys}^{+0}\text{NLeu}^{+0}$   , **74** (cyclo-14): 159 mg

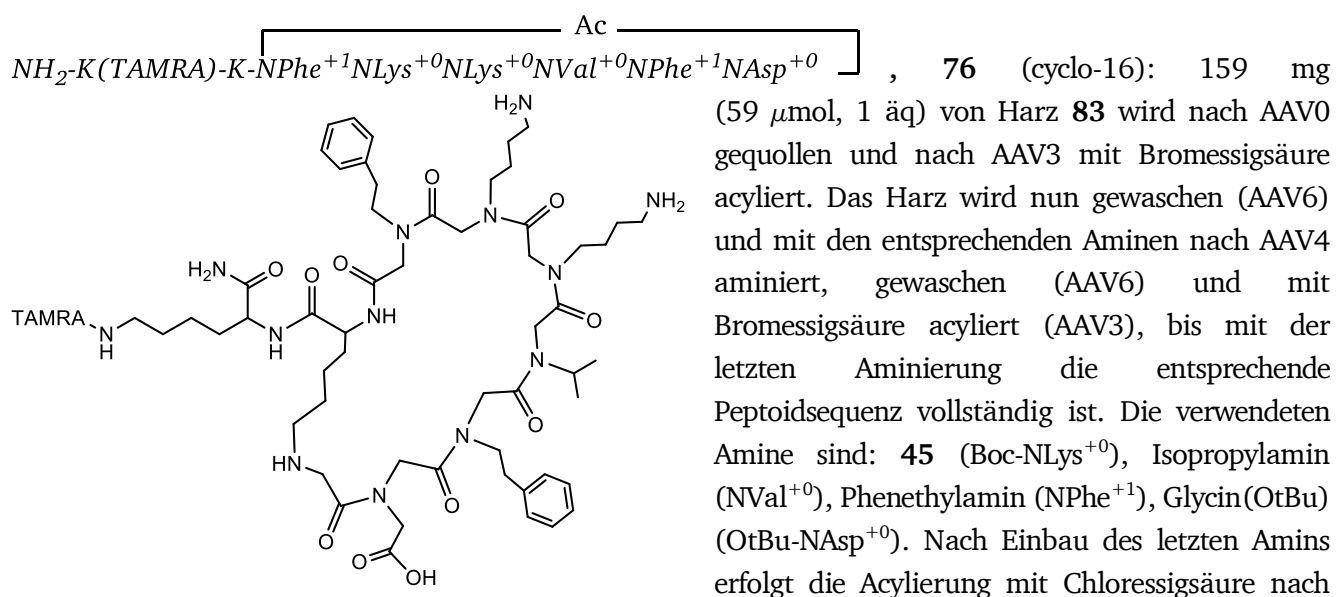
(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** ( $\text{Boc-NLys}^{+0}$ ), Isobutylamin ( $\text{NLeu}^{+0}$ ), Phenethylamin ( $\text{NPhe}^{+1}$ ), Isopropylamin ( $\text{NVal}^{+0}$ ). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure

nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 31.3 min und 31.7 min. ESI-MS,  $m/z$  (%): 1072.17 (100)  $[\text{M-H-TAMRA}]^-$ . Berechnete Masse: 1482.86 g/mol. Gemessene Masse: 1073.17 g/mol.

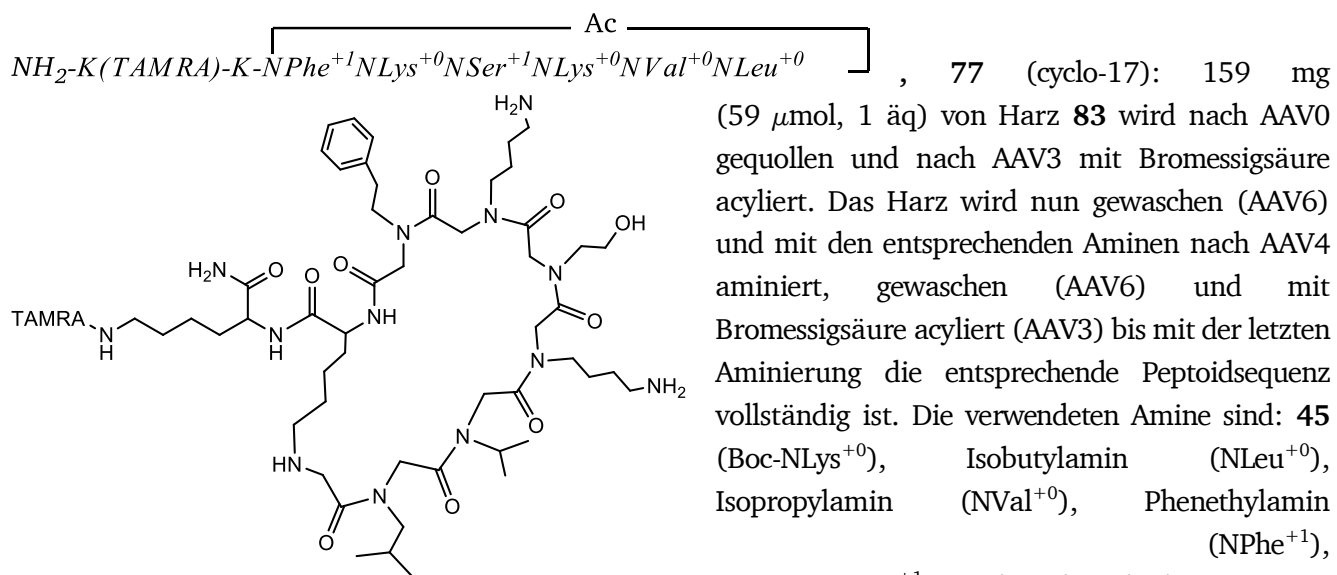
$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NPhe}^{+1}\text{NLys}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NLeu}^{+0}\text{NLys}^{+0}\text{NLeu}^{+0}$   , **75** (cyclo-15): 159 mg

(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Bromessigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Bromessigsäure acyliert (AAV3), bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** ( $\text{Boc-NLys}^{+0}$ ), Isobutylamin ( $\text{NLeu}^{+0}$ ), Phenethylamin ( $\text{NPhe}^{+1}$ ). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives

Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 29.5 min und 30.1 min. ESI-MS,  $m/z$  (%): 1084.87 (65)  $[\text{M-H-TAMRA}]^-$ . Berechnete Masse: 1496.87 g/mol. Gemessene Masse: 1085.87 g/mol.

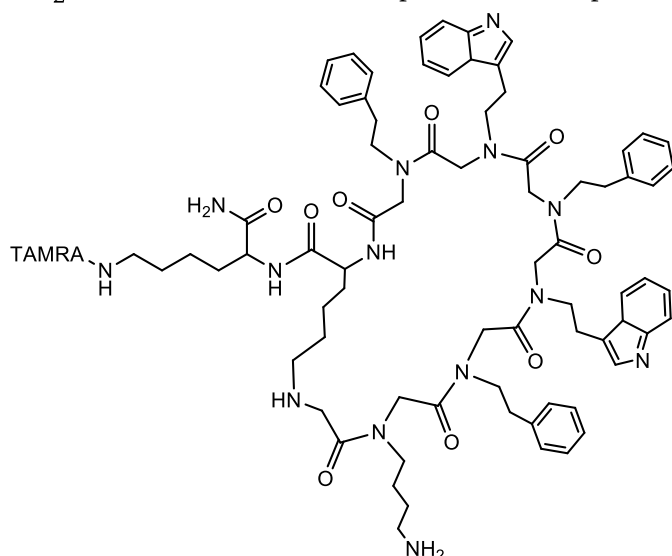


AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 28.6 min und 29.3 min. ESI-MS, m/z (%): 1106.87 (10) [M+H-TAMRA]<sup>+</sup>, 554.25 (25) [M+2H-TAMRA]<sup>+</sup>, 368.96 (100) [M+3H-TAMRA]<sup>+</sup>. Berechnete Masse: 1527.77 g/mol. Gemessene Masse: 1105.87 g/mol.



**48** (TIPS-NSer<sup>+1</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 31.3 min und 31.7 min. ESI-MS, m/z (%): 521.05 (100) [M-2H-TAMRA]<sup>-2</sup>. Berechnete Masse: 1455.79 g/mol. Gemessene Masse: 1044.1 g/mol.

$\text{NH}_2\text{-K(TAMRA)-K-NPhe}^{+1}\text{NTrp}^{+1}\text{NPhe}^{+1}\text{NTrp}^{+1}\text{NPhe}^{+1}\text{NLys}^{+0}$  Ac **78** (cyclo-18): 159 mg



(59  $\mu\text{mol}$ , 1 äq) von Harz **83** wird nach AAV0 gequollen und nach AAV3 mit Chloressigsäure acyliert. Das Harz wird nun gewaschen (AAV6) und mit den entsprechenden Aminen nach AAV4 aminiert, gewaschen (AAV6) und mit Chloressigsäure acyliert (AAV3) bis mit der letzten Aminierung die entsprechende Peptoidsequenz vollständig ist. Die verwendeten Amine sind: **45** (Boc-NLys<sup>+0</sup>), Phenethylamin (NPhe<sup>+1</sup>), Tryptamin (NTrp<sup>+1</sup>). Nach Einbau des letzten Amins erfolgt die Acylierung mit Chloressigsäure nach AAV3 und ein selektives Entschützen der Lysin-Seitenkette nach AAV10. Die Zyklisierung

erfolgt in 2 M DIPEA in DMF bei RT über Nacht bei 600 rpm auf dem Schüttler. Nach Waschen des Harzes nach AAV6 wird das Peptomer nach AAV12 entschützt und vom Harz abgespalten. Die Reinigung des Peptomers erfolgt durch RP-HPLC nach AAV15 (1 CV isokratisch 0 % Eluent B, 3 CV linearer Gradient von 0-75% Eluent B), die Retentionszeit der beiden Produkt-Isomere liegt bei 34.0 min und 35.0 min. ESI-MS, m/z (%): 1329.68 (10) [M-H-TAMRA]<sup>-</sup>. Berechnete Masse: 1736.81 g/mol. Gemessene Masse: 1330.68 g/mol.

### 6.5.3. Proteasestabilität von Peptiden

Um die Aktivität von Trypsin im Puffersystem zu überprüfen, werden 20  $\mu\text{L}$  einer 25  $\mu\text{M}$  N-Benzoyl-D,L-Arginin-p-nitroanilid (BAPNA)-Lösung in Puffer C mit 20  $\mu\text{L}$  einer 1.25  $\mu\text{U}$  Trypsin-Lösung in Puffer C über Nacht bei RT und 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. 20  $\mu\text{L}$  Trifluoressigsäure (TFA) wird zugegeben, um das Enzym auszufällen, und es wird für 3 min bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Hamilton-Spritze aufgenommen und durch RP-HPLC (linearer Gradient 0-100% Eluent B über 6 CV) mit Photodiodenarray Detektor analysiert. Als Referenz dient eine Lösung gleicher Zusammensetzung, bei der alle Komponenten sofort zusammenpipettiert und anschließend zentrifugiert werden. Der Analyt weist eine Retentionszeit von 19.1 min und wird bei einer Wellenlänge von 314 nm detektiert. Die Flächen unter den Peaks bei 19.1 min vor und nach Trypsinverdau werden integriert und miteinander verglichen. Eine Abnahme der Fläche zeigt eine Umsetzung des Substrates an.

---

20  $\mu$ L einer 25  $\mu$ M Lösung des Peptids (IL8RPCycloopsQ-TAMRA **25** oder IL8RPLoopsQ-Fluo **5**) in Puffer C wird mit 20  $\mu$ L einer 1.25  $\mu$ U Trypsin-Lösung in Puffer C über Nacht bei RT und 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. 20  $\mu$ L Trifluoressigsäure (TFA) wird zugegeben, um das Enzym auszufällen, und es wird für 3 min bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Hamilton-Spritze aufgenommen und durch RP18-HPLC (linearer Gradient 0-100% Eluent B über 6 CV) analysiert. Als Referenz dient eine Lösung gleicher Zusammensetzung, bei der alle Komponenten sofort zusammenpipettiert und anschließend zentrifugiert werden. IL8RPCycloopsQ-TAMRA **25** weist eine Retentionszeit von 18.5 min bei einer Wellenlänge von 550 nm auf, IL8RPLoopsQ-Fluo **5** eine von 19.9 min bei 440 nm. Die Flächen unter den Signalen werden integriert und mit den entsprechenden Referenzen verglichen. Eine Abnahme der Peakfläche zeigt qualitativ den Abbau des Peptids durch die Protease an.

---

#### 6.5.4. Mix-and-Split Synthese

---

Um die statistische Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass alle mögliche Sequenzen bei einer Mix-and-Split Synthese auf dem Syntheseharz entstehen, sollte die dreifache Menge an Syntheseharz eingesetzt werden, die nötig wäre, um jede mögliche Sequenz auf einem Partikel abzubilden.<sup>[304]</sup> Die Anzahl aller möglicher Sequenzen  $N$  ergibt sich aus dem Produkt der Anzahl aller verwendeten Monomere  $n_x$  in jedem Syntheseschritt  $x$ .

$$N = n_1 * n_2 * n_3 \dots n_x$$

##### Mix-and-Split Synthese einer Bibliothek zyklischer Pentapeptide

Die berechnete Menge an TentaGel MB HMBA Harz wird in einer 30 mL Spritze mit Filterfritte eingewogen, nach AAV0 gequollen und nach AAV5a mit 6-Aminohexansäure funktionalisiert. Nach Beladungsbestimmung des Harzes nach AAV7 wird das Harz nach AAV6 gewaschen und nach AAV8 entschützt. Nach erneutem Waschen nach AAV6 wird Fmoc-hCys(Trt)-OH nach AAV5a angebracht und der N-Terminus nach AAV8 entschützt. Im Anschluss daran wird das Harz nach AAV3 mit Chloressigsäure acyliert und nach AAV6 gewaschen. Die Partikel werden nun gleichmäßig in zehn 2 mL Spritzen mit Filterfritten aufgeteilt und nach AAV4 mit zehn verschiedenen Amin-Lösungen aminiert. Fünf der Amine (analog zu NLys<sup>+</sup>, NLeu<sup>+</sup>, NVal<sup>+</sup>, NAsp<sup>+</sup> und NPhe<sup>+</sup>) wurden aufgrund ihres hohen Vorkommens in Hits einer linearen Peptoid-Bibliothek<sup>[1]</sup> ausgewählt. Vier der Amine NAla<sup>+</sup>, NMet<sup>+</sup>, NArg<sup>+</sup> und NThr<sup>+</sup> kommen als analoge Aminosäuren im CXCL8-bindenden Peptid IL8RPLoopsE **6** vor und NHis<sup>+</sup> ist sehr kostengünstig erhältlich. Die Reaktion wird mittels Chloranil-Test nach AAV9 kontrolliert und das Harz nach AAV6 gewaschen. Das Harz wird wieder in der 30 mL Spritze vereinigt und nach AAV3 mit Choressigsäure acyliert. Diese Schritte werden insgesamt fünfmal wiederholt, bis die Pentamer-Sequenzen vollständig sind. Es folgt noch eine Acylierung nach AAV3 mit Chloressigsäure und die orthogonale Abspaltung der Tritylschutzgruppe vom Homo-Cystein nach AAV10. Nach mehrmaligem Waschen des Harzes mit DMF nach AAV6 wird es zur Zyklisierung der Sequenz über Nacht in 2 M DIPEA in DMF bei RT und 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Das Harz wird nochmals nach AAV6 gewaschen und die Seitenkettenschutzgruppen nach AAV12 entfernt. Nun wird das Harz erst nach AAV6 und schließlich mehrfach mit Puffer C neutral gewaschen.

OBOC-Bibliothek zyklischer Pentapeptide **38**:

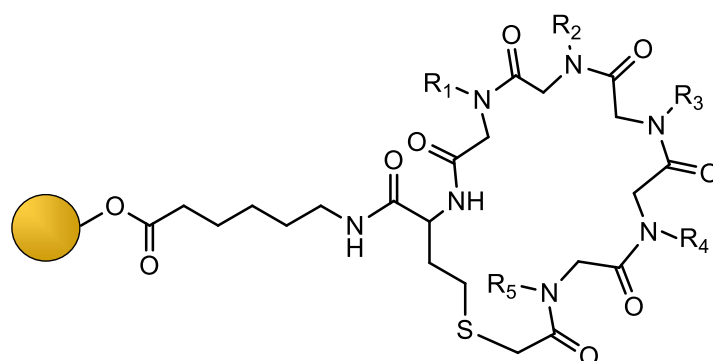


Tabelle 6.6: Mix-and-Split Bibliothek **38** mit  $10^5 = 100000$  möglichen Sequenzen.

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
NAla <sup>+0</sup>	NAla <sup>+0</sup>	NAla <sup>+0</sup>	NAla <sup>+0</sup>	NAla <sup>+0</sup>
NAsp <sup>+0</sup>	NAsp <sup>+0</sup>	NAsp <sup>+0</sup>	NAsp <sup>+0</sup>	NAsp <sup>+0</sup>
NPhe <sup>+1</sup>	NPhe <sup>+1</sup>	NPhe <sup>+1</sup>	NPhe <sup>+1</sup>	NPhe <sup>+1</sup>
NHis <sup>+1</sup>	NHis <sup>+1</sup>	NHis <sup>+1</sup>	NHis <sup>+1</sup>	NHis <sup>+1</sup>
NLeu <sup>+0</sup>	NLeu <sup>+0</sup>	NLeu <sup>+0</sup>	NLeu <sup>+0</sup>	NLeu <sup>+0</sup>
NLys <sup>+0</sup>	NLys <sup>+0</sup>	NLys <sup>+0</sup>	NLys <sup>+0</sup>	NLys <sup>+0</sup>
NMet <sup>+0</sup>	NMet <sup>+0</sup>	NMet <sup>+0</sup>	NMet <sup>+0</sup>	NMet <sup>+0</sup>
NArg <sup>+0</sup>	NArg <sup>+0</sup>	NArg <sup>+0</sup>	NArg <sup>+0</sup>	NArg <sup>+0</sup>
NThr <sup>+1</sup>	NThr <sup>+1</sup>	NThr <sup>+1</sup>	NThr <sup>+1</sup>	NThr <sup>+1</sup>
NVal <sup>+0</sup>	NVal <sup>+0</sup>	NVal <sup>+0</sup>	NVal <sup>+0</sup>	NVal <sup>+0</sup>

Die Mix-and-Split Synthese der OBOC-Bibliothek **38** wurde nach oben beschriebener Methode auf 2.1 g TentaGel MB HMBA Harz durchgeführt.

---

## 6.6. Screening von Substanzbibliotheken

---

Im Folgenden wird das Screening von OBOC-Bibliotheken mit zwei verschiedenen Methoden beschrieben. Des Weiteren wird die Methode der Magnetseparation angewendet um verschiedene CXCR1-exprimierende Zellen aus Suspensionen und Blut zu separieren.

---

### 6.6.1. 2-Kanal Fluoreszenzmikroskopie

---

Das Screening einer linearen Peptoid-Hexamer-Bibliothek durch 2-Kanal Fluoreszenzmikroskopie wurde von Dorothea Helmer in einer vorangegangenen Arbeit durchgeführt.<sup>[1]</sup> Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde dieses Verfahren mit bekannten Bindepeptiden validiert. Um ein Ausbleichen des Fluorophors während der Messungen auszuschließen, wurden alle Arbeitsschritte in einem verdunkelten Raum ohne direktes Licht durchgeführt und die Belichtungszeit des Partikel unter dem Mikroskop so niedrig wie möglich gehalten. Die Auswertung der Bilder erfolgte im Anschluss mit ImageJ.

#### Validierung der Methode mit einem System etablierter Bindungspartner

Jeweils 5 mg der auf TentaGel-Harz synthetisierten Streptavidin-Bindepeptide **27-32** werden separat in 5 mL-Spritzen mit Filterfritte für eine Stunde bei 600 rpm auf dem Schüttler in Puffer C gequollen. Anschließend wird das Harz mehrfach mit Puffer C gewaschen und die Partikel dann mit 100  $\mu$ L einer 10  $\mu$ M Streptavidin-DL550 Lösung für 3 h unter Lichtausschluss bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Als Negativkontrollen werden einige der Partikel ohne Inkubation in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und einige Partikel mit Streptavidin inkubiert. Als Positivkontrolle werden mit Biotin funktionalisierte Partikel **33** auf wie oben mit Streptavidin-DL550 behandelt. Das Harz wird anschließend fünfmal mit Puffer C gewaschen und einige wenige Partikel von jeder Art separat mit 20  $\mu$ L Puffer C in die Kavitäten einer schwarzen 384-well-Mikrotiterplatte mit transparentem Boden pipettiert. Um das Pipettieren zu vereinfachen, wird die Spitze der 200  $\mu$ L-Pipettenspitze dafür abgeschnitten. Die Mikrotiterplatte wird bei 2000 g für 2 min zentrifugiert, und es werden Hellfeld- und Fluoreszenzbilder (RHO-Kanal – Exzitation 538-562 nm/ Emission 570-640 nm, und FITC-Kanal – Exzitation 450-490 nm/ Emission 500-550 nm) am Fluoreszenzmikroskop mit automatisiertem x/y-Kreuztisch aufgenommen. Die Belichtungszeit im FITC-Kanal wird bei 40 ms gehalten, während die Belichtungszeit im RHO-Kanal zwischen 5 und 160 ms variiert wird.

---

### 6.6.2. Magnetseparation

---

Das Screening einer linearen Peptoid-Pentamer-Bibliothek durch Magnetseparation wurde erstmalig von Julia Wack, betreut im Rahmen dieser Arbeit, durchgeführt.<sup>[397]</sup> Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde dieses Verfahren mit bekannten Bindepeptiden validiert.



---

## Validierung der Methode mit einem System etablierter Bindungspartner

Jeweils 5 mg der auf TentaGel-Harz synthetisierten Streptavidin Bindepeptide **27-32** werden separat in 5 mL Spritzen mit Filterfritte für eine Stunde bei 600 rpm auf dem Schüttler in Puffer C + 0.1 % Tween-20 gequollen. Anschließend wird das Harz mehrfach mit Puffer C + 0.1 % Tween-20 gewaschen, in Mikrozentrifugationsröhrchen überführt, und die Partikel anschließend mit 20  $\mu$ L einer MPVA-C22 Magnetpartikelsuspension für 1 h bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Nach Abtrennen der Magnetpartikel mit einem Magnetseparator wird das Harz mit 20  $\mu$ L einer Streptavidin-Magnetpartikelsuspension **35** für 2 h bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die überschüssigen Magnetpartikel werden mit dem Magnetseparator abgetrennt und einige wenige Partikel von jeder Art separat mit 20  $\mu$ L Puffer C in die Kavitäten einer schwarzen 384-well-Mikrotiterplatte mit transparentem Boden pipettiert. Als Positivkontrolle werden mit Biotin funktionalisierte Partikel **33** mit einer Suspension von Streptavidin-Magnetpartikeln **35** behandelt wie beschrieben. Negativkontrollen wurden sowohl mit unfunktionalisierten TentaGel HMBA MB Partikeln und Streptavidin-Magnetpartikeln **35**, als auch mit den immobilisierten Bindepeptiden **27-32** und unfunktionalisierten MPVA-C22 Magnetpartikeln durchgeführt. Um das Pipettieren zu vereinfachen, wird die Spitze der 200  $\mu$ L-Pipettenspitze dafür abgeschnitten. Die Mikrotiterplatte wird bei 2000 g für 2 min zentrifugiert, und es werden Hellfeldbilder am Fluoreszenzmikroskop mit automatisiertem x/y-Kreuztisch aufgenommen.

## Affinitätsexperimente mit Zellen

*HEK293-CXCR1*:<sup>45</sup> 20  $\mu$ L einer Streptavidin-Magnetpartikelsuspension **35** werden mit 1 mL einer 10  $\mu$ M CXCL8-Biotin Lösung **4** versetzt und für eine Stunde bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Magnetpartikel werden dreimal mit Puffer C gewaschen und in 100  $\mu$ L Puffer C resuspendiert. Diese Suspension wird mit 200  $\mu$ L einer HEK293-Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Magnetpartikel mit daran gebundenen Zellen anschließend mit dem Magnetseparator abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und die Magnetpartikel zweimal mit Puffer C gewaschen. Eine Negativkontrolle wird auf gleiche Weise mit unfunktionalisierten MPVA-C22 Magnetpartikeln erstellt. Anschließend werden die Magnetpartikel im 1 mL Puffer C resuspendiert und in eine transparente 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Es werden Hellfeldbilder am Fluoreszenzmikroskop mit automatisiertem x/y-Kreuztisch aufgenommen.

*Neutrophile Granulozyten*:<sup>46</sup> 20  $\mu$ L einer Streptavidin-Magnetpartikelsuspension **35** werden mit 1 mL einer 10  $\mu$ M CXCL8-Biotin Lösung **4** versetzt und für eine Stunde bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Magnetpartikel werden dreimal mit Puffer C gewaschen und in 100  $\mu$ L Puffer C resuspendiert. Diese Suspension wird mit 200  $\mu$ L einer Suspension isolierter neutrophiler Granulozyten für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Magnetpartikel mit daran gebundenen Zellen anschließend mit dem Magnetseparator abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und die Magnetpartikel zweimal mit Puffer C gewaschen. Eine Negativkontrolle wird auf gleiche Weise mit unfunktionalisierten MPVA-C22 Magnetpartikeln erstellt. Anschließend werden die Magnetpartikel im 1 mL Puffer C resuspendiert und in eine transparente 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Es werden Hellfeldbilder am Fluoreszenzmikroskop mit automatisiertem x/y-Kreuztisch aufgenommen.

---

<sup>45</sup> Transfektion mit CXCR1 wurde von Dr. Marina Jöst durchgeführt, AK Schmitz, TU Darmstadt.

<sup>46</sup> Isoliert von Dr. Ina Rink, AK Schmitz, TU Darmstadt

---

*Isolierung von Zellen aus Blut:*<sup>47</sup> 20  $\mu$ L einer Streptavidin-Magnetpartikel Suspension **35** wird mit 1 mL einer 10  $\mu$ M CXCL8-Biotin-Lösung **4** versetzt und für eine Stunde bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Magnetpartikel werden dreimal mit Puffer C gewaschen und in 100  $\mu$ L Puffer C resuspendiert. Diese Suspension wird mit 200  $\mu$ L Vollblut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Magnetpartikel mit daran gebundenen Zellen anschließend mit dem Magnetseparator abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und die Magnetpartikel zweimal mit Puffer C gewaschen. Eine Negativkontrolle wird auf gleiche Weise mit unfunktionalisierten MPVA-C22 Magnetpartikeln erstellt. Anschließend werden die Magnetpartikel im 1 mL Puffer C resuspendiert und in eine transparente 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Es werden Hellfeldbilder am Fluoreszenzmikroskop mit automatisiertem x/y-Kreuztisch aufgenommen.

### **Selektion von Liganden aus einer OBOC-Bibliothek durch Magnetpartikel**

Die synthetisierte OBOC-Peptoid-Bibliothek **38** wird in einer 30 mL Spritze mit Filterfritte mehrfach mit Puffer C + 0.1 % Tween-20 gewaschen und anschließend mit 300  $\mu$ L einer MPVA-C22 Magnetpartikelsuspension für 3 h bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Nach Abtrennen der überschüssigen Magnetpartikel mit einem Magnetseparator werden diese mehrfach gewaschen. Harz-Partikel in diesem Gemisch, die sich durch einen Handmagneten mobilisieren lassen, werden mit diesem abgetrennt und in einem Mikrozentrifugenröhrchen gesammelt. Die Harzpartikel der Bibliothek werden erneut mit dem Handmagneten untersucht und mobilisierbare Partikel vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze von der Bibliothek getrennt und zu den vorher gesammelten Partikeln als unspezifische Binder pipettiert.

Zum Markieren positiver Hits wird die Bibliothek anschließend mit 1 mL einer 10  $\mu$ M CXCL8-Biotin Lösung **4** versetzt und für mindestens 3 h bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Das Harz wird zweimal mit Puffer C + 0.1 % Tween-20 gewaschen und mit 300  $\mu$ L einer Streptavidin-Magnetpartikel Suspension **35** für 3 h bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Nach Abtrennen der überschüssigen Magnetpartikel mit einem Magnetseparator werden diese mehrfach gewaschen und alle Syntheseharzpartikel darin mit einem Handmagneten auf Magnetismus untersucht. Partikel, die sich durch den Magneten mobilisieren lassen, werden in einem Mikrozentrifugenröhrchen als positive Hits gesammelt. Die restlichen Harzpartikel werden ebenfalls mit einem Handmagneten untersucht und mobilisierbare Partikel vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze von der Bibliothek getrennt und zu den gesammelten Partikeln pipettiert. Diese Partikel werden mit 40  $\mu$ L Puffer C + 0.1 % Tween-20 in die Kavitäten einer schwarzen 384-Well Mikrotiterplatte mit transparentem Boden pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird bei 2000 g für 2 min zentrifugiert, und es werden Hellfeldbilder am Fluoreszenzmikroskop mit automatisiertem x/y-Kreuztisch aufgenommen. Um die Magnetpartikel wieder von den Synthesepartikeln zu trennen, werden diese für eine Stunde in einer wässrigen 4 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (pH 7) und 50 mM Mercaptoethanol bei 600 rpm auf dem Schüttler inkubiert, die Magnetpartikel mit dem Magnetseparator abgetrennt und anschließend dreimal mit Puffer C + 0.1 % Tween-20 gewaschen.

---

<sup>47</sup> Eigenblut entnommen bei Medical Airport Service GmbH, Darmstadt

---

## 6.7. MD Simulationen

---

Alle Simulationen in dieser Arbeit wurden von Sven Jager und Philipp Babel durchgeführt.<sup>48</sup> Die Strukturen für die MD Simulationen der modellierten Peptide IL8RPLoopsQ 5, IL8RPLoopsE 6, IL8RPCycLoopsQ 25 und IL8RPCycLoopsE 26 wurden mit Hilfe von MODELLER erstellt.<sup>[465]</sup> Parameter für den 6-Aminohexansäure Linker wurden in Gromacs mit dem Gromos65atb Kraftfeld bestimmt.<sup>[466-467]</sup> Als Wassermolmodell wurde *extended simple point charge water* (SPC/E) verwendet. Es wurde mit einer kurzen Energieminimierung angefangen, bei der ein konjugierter Gradient bis zur Konvergenz der potentiellen Energie verwendet wurde. Anschließend wurde eine NVT Equilibrierung (constant Number of particles, Volume, and Temperature) durch V-rescale Temperaturkupplung für 2 ns und folgender NPT Equilibrierung (constant Number of particles, Pressure, and Temperature) durch Parrinello-Rahman Druckkupplung für 10 ns durchgeführt.<sup>[468-469]</sup> Die Simulation wurde daraufhin mit einer Integrationsschrittgröße von 2 fs und einer van-der-Waals-Wechselwirkungsgrenze von 1.0 nm bei einer Temperatur von 300 K und Wasserdichte von  $\rho = 1$  gestartet. Die Simulationsdauer betrug 100 ns mit einer Gesamtzahl von 10000 Frames. Für Driftkorrektur und periodische Sprünge wurden ein „Least square fit“ und eine „periodic boundary conditions“ Korrektur (PBC) mit Hilfe von trjconv angewendet.<sup>[467]</sup> Zur Quantifizierung von Strukturunterschieden und Konformationsänderungen für alle Peptide wurde die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) verwendet. Diese RMSD kann wie folgt berechnet werden:

$$RMSD(X_1, X_2) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{1,i} - x_{2,i})^2}$$

Die Anzahl der Atome ist  $n$  und  $x_{1,i}$  die Koordinaten des Atoms  $i$  in Peptid  $X_1$ . Der RMSD wird zur Quantifizierung eines Vergleich zwischen den Strukturen zweier Peptide  $X_1$  und  $X_2$  verwendet. Hier wurde der RMSD zwischen der Ausgangsstruktur und allen Frames berechnet. Die RMSD-Berechnung basiert auf den Atomkoordinaten der C-alpha-Atome und wird über alle Atome gemittelt. Um strukturelle Schwankungen zu analysieren, wurde die mittlere quadratische Fluktuation (RMSF) berechnet:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (x_i(t_j) - \tilde{x}_i)^2}$$

Die Dauer der Simulation ist  $T$  mit  $x_i$  als Koordinaten des Atoms  $i$  zum Zeitpunkt  $t_j$ .

Für die Sekundärstrukturquantifizierung wird die standardisierte Sekundärstrukturzuordnung, Define Secondary Structure of Proteins (DSSP), verwendet. DSSP beginnt mit der Identifizierung der intra-Rückgrat Wasserstoffbrücken des Peptids unter Verwendung einer reinen elektrostatischen Definition.

---

<sup>48</sup> AK Hamacher, TU Darmstadt.

---

Das mittlere Auftreten von Schleifen/Helixgehalt  $\langle H \rangle$  für den gesamten Produktionslauf der Simulation und der DSSP wird für jeden Frame mit R und bio3d berechnen.

Folgende aus DSSP abgeleitete sekundäre Strukturzustände wurden bestimmt: H =  $\alpha$ -Helix, B = Rückstand in isolierter  $\beta$ -Brücke, E = verlängerter Strang, G =  $3_{10}$ -Helix, T = Wasserstoffbindung, S = Biegung.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] D. Helmer, K. Brahm, C. Helmer, J. S. Wack, G. Brenner-Weiss, K. Schmitz, *Anal Methods-Uk* **2016**, 8, 4142-4152.
- [2] T. S. Burkoth, A. T. Fafarman, D. H. Charych, M. D. Connolly, R. N. Zuckermann, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 8841-8845.
- [3] D. Helmer, Dissertation thesis, TU Darmstadt (Darmstadt), **2015**.
- [4] G. M. Clore, E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, A. M. Gronenborn, *Biochemistry-Us* **1990**, 29, 1689-1696.
- [5] A. S. Culf, R. J. Ouellette, *Molecules* **2010**, 15, 5282-5335.
- [6] S. D. Kobayashi, F. R. DeLeo, *Wires Syst Biol Med* **2009**, 1, 309-333.
- [7] P. Friedl, B. Weigelin, *Nat Immunol* **2008**, 9, 960-969.
- [8] N. Dixit, S. I. Simon, *Front Immunol* **2012**, 3.
- [9] B. Petri, M. G. Bixel, *Febs J* **2006**, 273, 4399-4407.
- [10] W. A. Muller, *Circ Res* **2009**, 105, 223-230.
- [11] B. Moser, K. Willmann, *Ann Rheum Dis* **2004**, 63, 84-89.
- [12] B. Moser, M. Wolf, A. Walz, P. Loetscher, *Trends Immunol* **2004**, 25, 75-84.
- [13] I. Comerford, S. R. McColl, *Immunol Cell Biol* **2011**, 89, 183-184.
- [14] A. Zlotnik, O. Yoshie, *Immunity* **2012**, 36, 705-716.
- [15] J. W. Griffith, C. L. Sokol, A. D. Luster, *Annu Rev Immunol* **2014**, 32, 659-702.
- [16] M. Majka, A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak, K. Ehrenman, Z. Pietrzkowski, M. A. Kowalska, A. M. Gewirtz, S. G. Emerson, M. Z. Ratajczak, *Blood* **2001**, 97, 3075-3085.
- [17] Z. Brown, M. E. Gerritsen, W. W. Carley, R. M. Strieter, S. L. Kunkel, J. Westwick, *Am J Pathol* **1994**, 145, 913-921.
- [18] A. W. Stadnyk, *Can J Gastroenterol* **2002**, 16, 241-246.
- [19] J. Henningsen, B. K. Pedersen, I. Kratchmarova, *Mol Biosyst* **2011**, 7, 311-321.

- 
- [20] I. Oynebraten, O. Bakke, P. Brandtzaeg, F. E. Johansen, G. Haraldsen, *Blood* **2004**, *104*, 314-320.
- [21] N. Janabi, I. Hau, M. Tardieu, *J Immunol* **1999**, *162*, 1701-1706.
- [22] T. A. Springer, *Annu Rev Physiol* **1995**, *57*, 827-872.
- [23] E. F. Foxman, J. J. Campbell, E. C. Butcher, *J Cell Biol* **1997**, *139*, 1349-1360.
- [24] S. J. Allen, S. E. Crown, T. M. Handel, *Annual Review of Immunology* **2007**, *25*, 787-820.
- [25] E. J. Fernandez, E. Lolis, *Annu Rev Pharmacol* **2002**, *42*, 469-499.
- [26] P. M. Murphy, M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim, C. A. Power, *Pharmacol Rev* **2000**, *52*, 145-176.
- [27] R. M. Strieter, P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Vandamme, A. Walz, D. Marriott, S. Y. Chan, S. Roczniak, A. B. Shanafelt, *J Biol Chem* **1995**, *270*, 27348-27357.
- [28] Z. Johnson, A. E. Proudfoot, T. M. Handel, *Cytokine Growth F R* **2005**, *16*, 625-636.
- [29] T. S. Olson, K. Ley, *Am J Physiol-Reg I* **2002**, *283*, R7-R28.
- [30] S. Thiele, M. M. Rosenkilde, *Curr Med Chem* **2014**, *21*, 3594-3614.
- [31] M. P. Pruchniak, M. Arazna, U. Demkow, *Resp Physiol Neurobi* **2013**, *187*, 68-73.
- [32] F. Bachelierie, G. J. Graham, M. Locati, A. Mantovani, P. M. Murphy, R. Nibbs, A. Rot, S. Sozzani, M. Thelen, *Nature immunology* **2014**, *15*, 207-208.
- [33] T. Yoshimura, E. A. Robinson, E. Appella, K. Matsushima, S. D. Showalter, A. Skeel, E. J. Leonard, *Mol Immunol* **1989**, *26*, 87-93.
- [34] T. Yoshimura, K. Matsushima, S. Tanaka, E. A. Robinson, E. Appella, J. J. Oppenheim, E. J. Leonard, *P Natl Acad Sci USA* **1987**, *84*, 9233-9237.
- [35] A. Mortier, N. Berghmans, I. Ronsse, K. Grauwen, S. Stegen, J. Van Damme, P. Proost, *Plos One* **2011**, *6*.
- [36] M. Baggiolini, B. Dewald, B. Moser, *Annual Review of Immunology* **1997**, *15*, 675-705.
- [37] M. Baggiolini, I. Clarklewis, *Febs Lett* **1992**, *307*, 97-101.
- [38] C. A. Hebert, J. B. Baker, *Cancer Invest* **1993**, *11*, 743-750.

- 
- [39] J. Vandamme, J. Vanbeeumen, R. Conings, B. Decock, A. Billiau, *Eur J Biochem* **1989**, *181*, 337-344.
- [40] H. Fernando, C. Chin, J. Rosgen, K. Rajarathnam, *J Biol Chem* **2004**, *279*, 36175-36178.
- [41] H. B. Lowman, W. J. Fairbrother, P. H. Slagle, R. Kabakoff, J. Liu, S. Shire, C. A. Hebert, *Protein Sci* **1997**, *6*, 598-608.
- [42] S. D. Burrows, M. L. Doyle, K. P. Murphy, S. G. Franklin, J. R. White, I. Brooks, D. E. McNulty, M. O. Scott, J. R. Knutson, D. Porter, P. R. Young, P. Hensley, *Biochemistry-Us* **1994**, *33*, 12741-12745.
- [43] B. Goger, Y. Halden, A. Rek, R. Mosl, D. Pye, J. Gallagher, A. J. Kungl, *Biochemistry-Us* **2002**, *41*, 1640-1646.
- [44] W. Schnitzel, U. Monschein, J. Besemer, *J Leukocyte Biol* **1994**, *55*, 763-770.
- [45] P. Gangavarapu, L. Rajagopalan, D. Kolli, A. Guerrero-Plata, R. P. Garofalo, K. Rajarathnam, *J Leukocyte Biol* **2012**, *91*, 259-265.
- [46] S. T. Das, L. Rajagopalan, A. Guerrero-Plata, J. Sai, A. Richmond, R. P. Garofalo, K. Rajarathnam, *Plos One* **2010**, *5*.
- [47] M. W. Nasser, S. K. Raghuwanshi, D. J. Grant, V. R. Jala, K. Rajarathnam, R. M. Richardson, *J Immunol* **2009**, *183*, 3425-3432.
- [48] S. H. Park, F. Casagrande, L. Cho, L. Albrecht, S. J. Opella, *Journal of molecular biology* **2011**, *414*, 194-203.
- [49] K. Rajarathnam, B. D. Sykes, C. M. Kay, B. Dewald, T. Geiser, M. Baggiolini, I. Clarklewis, *Science* **1994**, *264*, 90-92.
- [50] E. T. Baldwin, I. T. Weber, R. Stcharles, J. C. Xuan, E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, B. F. P. Edwards, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Wlodawer, *P Natl Acad Sci USA* **1991**, *88*, 502-506.
- [51] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Faseb J* **1995**, *9*, 57-62.
- [52] W. E. Holmes, J. Lee, W. J. Kuang, G. C. Rice, W. I. Wood, *Science* **1991**, *253*, 1278-1280.
- [53] P. M. Murphy, H. L. Tiffany, *Science* **1991**, *253*, 1280-1283.
- [54] J. Lee, R. Horuk, G. C. Rice, G. L. Bennett, T. Camerato, W. I. Wood, *J Biol Chem* **1992**, *267*, 16283-16287.
- [55] L. M. Campbell, P. J. Maxwell, D. J. Waugh, *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 929-959.



- 
- [56] M. W. Nasser, S. K. Raghuwanshi, K. M. Malloy, P. Gangavarapu, J. Y. Shim, K. Rajarathnam, R. M. Richardson, *J Biol Chem* **2007**, 282, 6906-6915.
- [57] A. K. Samanta, J. J. Oppenheim, K. Matsushima, *J Biol Chem* **1990**, 265, 183-189.
- [58] F. Balkwill, *Nat Rev Cancer* **2004**, 4, 540-550.
- [59] J. Bernhagen, R. Krohn, H. Lue, J. L. Gregory, A. Zerneck, R. R. Koenen, M. Dewor, I. Georgiev, A. Schober, L. Leng, T. Kooistra, G. Fingerle-Rowson, P. Ghezzi, R. Kleemann, S. R. McColl, R. Bucala, M. J. Hickey, C. Weber, *Nat Med* **2007**, 13, 587-596.
- [60] A. Chuntharapai, J. Lee, C. A. Hebert, K. J. Kim, *J Immunol* **1994**, 153, 5682-5688.
- [61] M. Wolf, M. B. Delgado, S. A. Jones, B. Dewald, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, *Eur J Immunol* **1998**, 28, 164-170.
- [62] T. J. Daly, G. J. Larosa, S. Dolich, T. E. Maione, S. Cooper, H. E. Broxmeyer, *J Biol Chem* **1995**, 270, 23282-23292.
- [63] M. A. Williams, C. M. Cave, G. Quaid, C. Robinson, T. J. Daly, D. Witt, A. B. Lentsch, J. S. Solomkin, *Shock* **2005**, 23, 371-376.
- [64] M. Horcher, A. Rot, H. Aschauer, J. Besemer, *Cytokine* **1998**, 10, 1-12.
- [65] K. Rajarathnam, G. N. Prado, H. Fernando, I. Clark-Lewis, J. Navarro, *Biochemistry* **2006**, 45, 7882-7888.
- [66] K. Rajarathnam, I. ClarkLewis, B. D. Sykes, *Biochemistry-Us* **1995**, 34, 12983-12990.
- [67] K. Rajarathnam, C. M. Kay, I. ClarkLewis, B. D. Sykes, *Chemokines* **1997**, 287, 89-105.
- [68] H. Fernando, G. T. Nagle, K. Rajarathnam, *Febs J* **2007**, 274, 241-251.
- [69] I. ClarkLewis, C. Schumacher, M. Baggiolini, B. Moser, *J Biol Chem* **1991**, 266, 23128-23134.
- [70] C. A. Hebert, R. V. Vitangcol, J. B. Baker, *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 18989-18994.
- [71] S. R. Leong, R. C. Kabakoff, C. A. Hebert, *J Biol Chem* **1994**, 269, 19343-19348.
- [72] C. A. Hebert, A. Chuntharapai, M. Smith, T. Colby, J. Kim, R. Horuk, *J Biol Chem* **1993**, 268, 18549-18553.
- [73] G. J. Larosa, K. M. Thomas, M. E. Kaufmann, R. Mark, M. White, L. Taylor, G. Gray, D. Witt, J. Navarro, *J Biol Chem* **1992**, 267, 25402-25406.
- [74] R. T. Clubb, J. G. Omichinski, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Febs Lett* **1994**, 338, 93-97.

- 
- [75] I. Clarklewis, B. Dewald, M. Loetscher, B. Moser, M. Baggiolini, *J Biol Chem* **1994**, 269, 16075-16081.
- [76] I. Clarklewis, K. S. Kim, K. Rajarathnam, J. H. Gong, B. Dewald, B. Moser, M. Baggiolini, B. D. Sykes, *J Leukocyte Biol* **1995**, 57, 703-711.
- [77] N. J. Skelton, C. Quan, D. Reilly, H. Lowman, *Structure* **1999**, 7, 157-168.
- [78] L. Rajagopalan, K. Rajarathnam, *Bioscience Reports* **2006**, 26, 325-339.
- [79] E. F. Barter, M. J. Stone, *Biochemistry* **2012**, 51, 1322-1331.
- [80] D. P. Witt, A. D. Lander, *Curr Biol* **1994**, 4, 394-400.
- [81] A. Rot, *Eur J Immunol* **1993**, 23, 303-306.
- [82] A. J. Hoogewerf, G. S. V. Kuschert, A. E. I. Proudfoot, F. Borlat, I. ClarkLewis, C. A. Power, T. N. C. Wells, *Biochemistry-Us* **1997**, 36, 13570-13578.
- [83] J. Middleton, A. M. Patterson, L. Gardner, C. Schmutz, B. A. Ashton, *Blood* **2002**, 100, 3853-3860.
- [84] R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *Bioessays* **1998**, 20, 156-167.
- [85] D. J. Hamel, I. Sielaff, A. E. I. Proudfoot, T. M. Handel, *Methods in Enzymology, Vol 461: Chemokines, Part B* **2009**, 461, 71-102.
- [86] A. D. Lander, S. B. Selleck, *J Cell Biol* **2000**, 148, 227-232.
- [87] G. S. V. Kuschert, A. J. Hoogewerf, A. E. I. Proudfoot, C. W. Chung, R. M. Cooke, R. E. Hubbard, T. N. C. Wells, P. N. Sanderson, *Biochemistry-Us* **1998**, 37, 11193-11201.
- [88] J. Middleton, S. Neil, J. Wintle, I. ClarkLewis, H. Moore, C. Lam, M. Auer, E. Hub, A. Rot, *Cell* **1997**, 91, 385-395.
- [89] A. D. Cardin, H. J. R. Weintraub, *Arteriosclerosis* **1989**, 9, 21-32.
- [90] S. Massena, G. Christoffersson, E. Hjertstrom, E. Zcharia, I. Vlodavsky, N. Ausmees, C. Rolny, J. P. Li, M. Phillipson, *Blood* **2010**, 116, 1924-1931.
- [91] A. E. I. Proudfoot, T. M. Handel, Z. Johnson, E. K. Lau, P. LiWang, I. Clark-Lewis, F. Borlat, T. N. C. Wells, M. H. Kosco-Vilbois, *P Natl Acad Sci USA* **2003**, 100, 1885-1890.
- [92] L. Wagner, O. O. Yang, E. A. Garcia-Zepeda, Y. M. Ge, S. A. Kalams, B. D. Walker, M. S. Pasternack, A. D. Luster, *Nature* **1998**, 391, 908-911.
- [93] S. H. Zigmond, *J Cell Biol* **1977**, 75, 606-616.

- 
- [94] J. G. Wagner, R. A. Roth, *Pharmacol Rev* **2000**, 52, 349-374.
- [95] M. B. Lawrence, T. A. Springer, *Cell* **1991**, 65, 859-873.
- [96] U. H. Vonandrian, J. D. Chambers, L. M. Mcevoy, R. F. Bargatze, K. E. Arfors, E. C. Butcher, *P Natl Acad Sci USA* **1991**, 88, 7538-7542.
- [97] K. Konstantopoulos, L. V. McIntire, *J Clin Invest* **1996**, 98, 2661-2665.
- [98] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh, *Nat Rev Immunol* **2007**, 7, 678-689.
- [99] E. Kolaczowska, P. Kubes, *Nat Rev Immunol* **2013**, 13, 159-175.
- [100] P. Sundd, M. K. Pospieszalska, K. Ley, *Mol Immunol* **2013**, 55, 59-69.
- [101] T. Yago, J. H. Wu, C. D. Wey, A. G. Klopocki, C. Zhu, R. P. McEver, *J Cell Biol* **2004**, 166, 913-923.
- [102] K. L. Moore, K. D. Patel, R. E. Bruehl, F. G. Li, D. A. Johnson, H. S. Lichenstein, R. D. Cummings, D. F. Bainton, R. P. McEver, *J Cell Biol* **1995**, 128, 661-671.
- [103] R. Alon, D. A. Hammer, T. A. Springer, *Nature* **1995**, 374, 539-542.
- [104] V. Ramachandran, M. Williams, T. Yago, D. W. Schmidtke, R. P. McEver, *P Natl Acad Sci USA* **2004**, 101, 13519-13524.
- [105] C. D. Sadik, N. D. Kim, A. D. Luster, *Trends Immunol* **2011**, 32, 452-460.
- [106] A. BurkeGaffney, P. G. Hellewell, *Brit J Pharmacol* **1996**, 119, 1149-1158.
- [107] R. P. Schleimer, B. K. Rutledge, *J Immunol* **1986**, 136, 649-654.
- [108] D. Proebstl, M. B. Voisin, A. Woodfin, J. Whiteford, F. D'Acquisto, G. E. Jones, D. Rowe, S. Nourshargh, *J Exp Med* **2012**, 209, 1219-1234.
- [109] S. J. Wang, M. B. Voisin, K. Y. Larbi, J. Dangerfield, C. Scheiermann, M. Tran, P. H. Maxwell, L. Sorokin, S. Nourshargh, *J Exp Med* **2006**, 203, 1519-1532.
- [110] K. Stark, A. Eckart, S. Haidari, A. Tirniceriu, M. Lorenz, M. L. von Bruhl, F. Gartner, A. G. Khandoga, K. R. Legate, R. Pless, I. Hepper, K. Lauber, B. Walzog, S. Massberg, *Nat Immunol* **2013**, 14, 41-51.
- [111] F. Lin, C. M. C. Nguyen, S. J. Wang, W. Saadi, S. P. Gross, N. L. Jeon, *Biochemical and biophysical research communications* **2004**, 319, 576-581.
- [112] C. Gerard, B. J. Rollins, *Nat Immunol* **2001**, 2, 108-115.

- 
- [113] C. McManus, J. W. Berman, F. M. Brett, H. Staunton, M. Farrell, C. F. Brosnan, *J Neuroimmunol* **1998**, 86, 20-29.
- [114] N. Godessart, S. L. Kunkel, *Curr Opin Immunol* **2001**, 13, 670-675.
- [115] M. D. Turner, B. Nedjai, T. Hurst, D. J. Pennington, *Bba-Mol Cell Res* **2014**, 1843, 2563-2582.
- [116] D. Raman, T. Sobolik-Delmaire, A. Richmond, *Exp Cell Res* **2011**, 317, 575-589.
- [117] X. F. Liao, T. Pirapakaran, X. M. Luo, *Mediat Inflamm* **2016**.
- [118] G. C. Tsokos, *New Engl J Med* **2011**, 365, 2110-2121.
- [119] M. Lech, H. J. Anders, *J Am Soc Nephrol* **2013**, 24, 1357-1366.
- [120] O. M. Steinmetz, J. Velden, U. Kneissler, M. Marx, A. Klein, U. Helmchen, R. A. K. Stahl, U. Panzer, *Kidney Int* **2008**, 74, 448-457.
- [121] O. M. Steinmetz, J. E. Turner, H. J. Paust, M. Lindner, A. Peters, K. Heiss, J. Velden, H. Hopfer, S. Fehr, T. Krieger, C. Meyer-Schwesinger, T. N. Meyer, U. Helmchen, H. W. Mittrucker, R. A. K. Stahl, U. Panzer, *J Immunol* **2009**, 183, 4693-4704.
- [122] K. Worthmann, F. Gueler, S. von Vietinghoff, A. Davalos-Militz, F. Wiehler, A. Davidson, T. Witte, H. Haller, M. Schiffer, C. S. Falk, L. Schiffer, *Clin Exp Immunol* **2014**, 178, 20-27.
- [123] A. Wang, P. Guilpain, B. F. Chong, S. Chouzenoux, L. Guillevin, Y. Du, X. J. Zhou, F. M. Lin, A. M. Fairhurst, C. Boudreaux, C. Roux, E. K. Wakeland, L. S. Davis, F. Batteux, C. Mohan, *Arthritis Rheum-Us* **2010**, 62, 3436-3446.
- [124] Z. Amoura, C. Combadiere, S. Faure, C. Parizot, M. Miyara, D. Raphael, P. Ghillani, P. Debre, J. C. Piette, G. Gorochoy, *Arthritis Rheum-Us* **2003**, 48, 3487-3496.
- [125] V. Biajoux, A. Bignon, C. Freitas, V. Martinez, M. Thelen, G. Lima, J. Jakez-Ocampo, D. Emilie, L. Llorente, K. Balabanian, *J Transl Med* **2012**, 10.
- [126] H. Hanaoka, Y. Okazaki, A. Hashiguchi, H. Yasuoka, T. Takeuchi, M. Kuwana, *Clin Exp Rheumatol* **2015**, 33, 863-870.
- [127] H. J. Anders, E. Belemzova, V. Eis, S. Segerer, V. Vielhauer, G. P. De Lema, M. Kretzler, C. D. Cohen, M. Frink, R. Horuk, K. L. Hudkins, C. E. Alpers, F. Mampaso, D. Schlondorff, *J Am Soc Nephrol* **2004**, 15, 1504-1513.
- [128] P. Enghard, J. Y. Humrich, B. Rudolph, S. Rosenberger, R. Biesen, A. Kuhn, R. Manz, F. Hiepe, A. Radbruch, G. R. Burmester, G. Riemekasten, *Arthritis Rheum-Us* **2009**, 60, 199-206.
- [129] M. I. W. Nicholas, M. A. Dooley, S. L. Hogan, J. Anolik, J. Looney, I. Sanz, S. H. Clarke, *Clin Immunol* **2008**, 126, 189-201.

- 
- [130] K. Furuichi, T. Wada, N. Sakai, Y. Iwata, K. Yoshimoto, M. Shimizu, K. Kobayashi, K. Takasawa, H. Kida, S. Takeda, N. Mukaida, K. Matsushima, H. Yokoyama, *Am J Nephrol* **2000**, *20*, 291-299.
- [131] S. Segerer, M. Mack, H. Regele, D. Kerjaschki, D. Schlondorff, *Kidney Int* **1999**, *56*, 52-64.
- [132] S. Yoshimoto, K. Nakatani, M. Iwano, O. Asai, K. I. Samejima, H. Sakan, M. Terada, K. Harada, Y. Akai, H. Shiiki, M. Nose, Y. Saito, *Am J Kidney Dis* **2007**, *50*, 47-58.
- [133] M. M. Wong, E. N. Fish, *Semin Immunol* **2003**, *15*, 5-14.
- [134] Z. Szekanecz, M. M. Halloran, J. M. Woods, M. V. Volin, G. K. Haines, A. E. Koch, *Arthritis Res Ther* **2001**, *3*.
- [135] S. A. Luther, J. G. Cyster, *Nat Immunol* **2001**, *2*, 102-107.
- [136] M. Hogan, B. Sherry, C. Ritchlin, M. Fabre, R. Winchester, A. Cerami, R. Bucala, *Cytokine* **1994**, *6*, 61-69.
- [137] A. E. Koch, S. L. Kunkel, J. C. Burrows, H. L. Evanoff, G. K. Haines, R. M. Pope, R. M. Strieter, *J Immunol* **1991**, *147*, 2187-2195.
- [138] H. Endo, T. Akahoshi, K. Takagishi, S. Kashiwazaki, K. Matsushima, *Lymphokine Cytok Res* **1991**, *10*, 245-252.
- [139] M. Seitz, B. Dewald, M. Ceska, N. Gerber, M. Baggiolini, *Rheumatol Int* **1992**, *12*, 159-164.
- [140] H. Endo, T. Akahoshi, A. Nishimura, M. Tonegawa, K. Takagishi, S. Kashiwazaki, K. Matsushima, H. Kondo, *Clin Exp Immunol* **1994**, *96*, 31-35.
- [141] M. C. Kraan, D. D. Patel, J. J. Haringman, M. D. Smith, H. Weedon, M. J. Ahern, F. C. Breedveld, P. P. Tak, *Arthritis Res* **2001**, *3*, 65-71.
- [142] A. Harada, N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida, K. Matsushima, *J Leukocyte Biol* **1994**, *56*, 559-564.
- [143] A. Nishimura, T. Akahoshi, M. Takahashi, K. Takagishi, M. Itoman, H. Kondo, Y. Takahashi, K. Yokoi, N. Mukaida, K. Matsushima, *J Leukocyte Biol* **1997**, *62*, 444-449.
- [144] P. L. Podolin, B. J. Bolognese, J. J. Foley, D. B. Schmidt, P. T. Buckley, K. L. Widdowson, Q. Jin, J. R. White, J. M. Lee, R. B. Goodman, T. R. Hagen, O. Kajikawa, L. A. Marshall, D. W. P. Hay, H. M. Sarau, *J Immunol* **2002**, *169*, 6435-6444.
- [145] A. Matsukawa, T. Yoshimura, K. Fujiwara, T. Maeda, S. Ohkawara, M. Yoshinaga, *Lab Invest* **1999**, *79*, 591-600.
- [146] T. Akahoshi, H. Endo, H. Kondo, S. Kashiwazaki, T. Kasahara, N. Mukaida, A. Harada, K. Matsushima, *Lymphokine Cytok Res* **1994**, *13*, 113-116.

- 
- [147] I. F. Charo, M. B. Taubman, *Circ Res* **2004**, 95, 858-866.
- [148] C. Weber, A. Schober, A. Zerneck, *Arterioscl Throm Vas* **2004**, 24, 1997-2008.
- [149] P. Libby, *Am J Clin Nutr* **2006**, 83, 456s-460s.
- [150] C. A. Gleissner, I. Shaked, C. Erbel, D. Bockler, H. A. Katus, K. Ley, *Circ Res* **2010**, 106, 203-211.
- [151] T. O. Nossuli, N. G. Frangogiannis, P. Knuefermann, V. Lakshminarayanan, O. Dewald, A. J. Evans, J. Peschon, D. L. Mann, L. H. Michael, M. L. Entman, *Am J Physiol-Heart C* **2001**, 281, H2549-H2558.
- [152] S. M. Cardona, J. A. Garcia, A. E. Cardona, *Methods in molecular biology* **2013**, 1013, 1-16.
- [153] N. G. Frangogiannis, K. A. Youker, R. D. Rossen, M. Gwechenberger, M. H. Lindsey, L. H. Mendoza, L. H. Michael, C. M. Ballantyne, C. W. Smith, M. L. Entman, *J Mol Cell Cardiol* **1998**, 30, 2567-2576.
- [154] F. Montecucco, V. Braunersreuther, S. Lenglet, B. M. A. Delattre, G. Pelli, V. Buatois, F. Guilhot, K. Galan, N. Vuilleumier, W. Ferlin, N. Fischer, J. P. Vallee, M. Kosco-Vilbois, F. Mach, *Eur Heart J* **2012**, 33, 1964-1974.
- [155] G. L. Kukiela, C. W. Smith, G. J. Larosa, A. M. Manning, L. H. Mendoza, T. J. Daly, B. J. Hughes, K. A. Youker, H. K. Hawkins, L. H. Michael, A. Rot, M. L. Entman, *J Clin Invest* **1995**, 95, 89-103.
- [156] H. G. Rus, R. Vlaicu, F. Niculescu, *Atherosclerosis* **1996**, 127, 263-271.
- [157] J. Apostolopoulos, P. Davenport, P. G. Tipping, *Arterioscl Throm Vas* **1996**, 16, 1007-1012.
- [158] A. Simonini, M. Moscucci, D. W. M. Muller, E. R. Bates, F. D. Pagani, M. D. Burdick, R. M. Strieter, *Circulation* **2000**, 101, 1519-1526.
- [159] E. M. Boyle, J. C. Kovach, C. A. Hebert, T. G. Canty, E. Chi, E. N. Morgan, T. H. Pohlman, E. D. Verrier, *J Thorac Cardiovasc Sur* **1998**, 116, 114-120.
- [160] R. E. Smith, R. M. Strieter, K. Zhang, S. H. Phan, T. J. Standiford, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, *J Leukocyte Biol* **1995**, 57, 782-787.
- [161] S. M. Pope, P. C. Fulkerson, C. Blanchard, H. S. Akei, N. M. Nikolaidis, N. Zimmermann, J. D. Molkentin, M. E. Rothenberg, *J Biol Chem* **2005**, 280, 13952-13961.
- [162] T. Dragic, V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. X. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, W. A. Paxton, *Nature* **1996**, 381, 667-673.
- [163] V. M. Dong, D. H. McDermott, R. Abdi, *Eur J Dermatol* **2003**, 13, 224-230.

- 
- [164] E. A. Eugenin, K. Osiecki, L. Lopez, H. Goldstein, T. M. Calderon, J. W. Berman, *J Neurosci* **2006**, 26, 1098-1106.
- [165] L. Weiss, A. SiMohamed, P. Giral, P. Castiel, A. Ledur, C. Blondin, M. D. Kazatchkine, N. HaeflnerCavaillon, *J Infect Dis* **1997**, 176, 1621-1624.
- [166] M. Q. Xia, B. T. Hyman, *J Neurovirol* **1999**, 5, 32-41.
- [167] R. P. MacDermott, I. R. Sanderson, H. C. Reinecker, *Inflamm Bowel Dis* **1998**, 4, 54-67.
- [168] H. J. Anders, V. Vielhauer, D. Schlondorff, *Kidney Int* **2003**, 63, 401-415.
- [169] S. Segerer, P. J. Nelson, D. Schlondorff, *J Am Soc Nephrol* **2000**, 11, 152-176.
- [170] D. Schlondorff, P. J. Nelson, B. Luckow, B. Banas, *Kidney Int* **1997**, 51, 610-621.
- [171] F. Marra, F. Tacke, *Gastroenterology* **2014**, 147, 577-+.
- [172] T. Pollicino, L. Bellinghieri, A. Restuccia, G. Raffa, C. Musolino, A. Alibrandi, D. Teti, G. Raimondo, *Virology* **2013**, 444, 317-328.
- [173] R. Daig, T. Andus, E. Aschenbrenner, W. Falk, J. Scholmerich, V. Gross, *Gut* **1996**, 38, 216-222.
- [174] K. Mitsuyama, A. Toyonaga, E. Sasaki, K. Watanabe, H. Tateishi, T. Nishiyama, T. Saiki, H. Ikeda, O. Tsuruta, K. Tanikawa, *Clin Exp Immunol* **1994**, 96, 432-436.
- [175] S. A. Sarkar, C. E. Lee, F. Victorino, T. T. Nguyen, J. A. Walters, A. Burrack, J. Eberlein, S. K. Hildemann, D. Homann, *Diabetes* **2012**, 61, 436-446.
- [176] A. Zlotnik, *Int J Cancer* **2006**, 119, 2026-2029.
- [177] I. Takanami, *Int J Cancer* **2003**, 105, 186-189.
- [178] M. B. Sporn, A. B. Roberts, *Nature* **1985**, 313, 745-747.
- [179] M. Miyamoto, Y. Shimizu, K. Okada, Y. Kashii, K. Higuchi, A. Watanabe, *Cancer Immunol Immun* **1998**, 47, 47-57.
- [180] A. Moller, U. Lippert, D. Lessmann, G. Kolde, K. Hamann, P. Welker, D. Schadendorf, T. Rosenbach, T. Luger, B. M. Czarnetzki, *J Immunol* **1993**, 151, 3261-3266.
- [181] D. Schadendorf, A. Moller, B. Algermissen, M. Worm, M. Sticherling, B. M. Czarnetzki, *J Immunol* **1993**, 151, 2667-2675.
- [182] R. Brew, J. S. Erikson, D. C. West, A. R. Kinsella, J. Slavin, S. E. Christmas, *Cytokine* **2000**, 12, 78-85.



- 
- [183] R. Liu, W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, N. R. Landau, *Cell* **1996**, 86, 367-377.
- [184] M. Samson, F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. J. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, R. W. Doms, G. Vassart, M. Parmentier, *Nature* **1996**, 382, 722-725.
- [185] J. R. White, J. M. Lee, P. R. Young, R. P. Hertzberg, A. J. Jurewicz, M. A. Chaikin, K. Widdowson, J. J. Foley, L. D. Martin, D. E. Griswold, H. M. Sarau, *J Biol Chem* **1998**, 273, 10095-10098.
- [186] J. Hesselgesser, H. P. Ng, M. Liang, W. Zheng, K. May, J. G. Bauman, S. Monahan, I. Islam, G. P. Wei, A. Ghannam, D. D. Taub, M. Rosser, R. M. Snider, M. M. Morrissey, H. D. Perez, R. Horuk, *J Biol Chem* **1998**, 273, 15687-15692.
- [187] M. Westby, E. van der Ryst, *Antiviral chemistry & chemotherapy* **2005**, 16, 339-354.
- [188] S. M. Woollard, G. D. Kanmogne, *Drug design, development and therapy* **2015**, 9, 5447-5468.
- [189] A. E. I. Proudfoot, C. A. Power, C. Rommel, T. N. C. Wells, *Semin Immunol* **2003**, 15, 57-65.
- [190] A. E. I. Proudfoot, *Nat Rev Immunol* **2002**, 2, 106-115.
- [191] M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, S. Fernandez, A. M. de Ana, D. R. Jones, J. L. Toran, C. Martinez-A, *Embo Journal* **2001**, 20, 2497-2507.
- [192] M. P. Wymann, K. Bjorklof, R. Calvez, P. Finan, M. Thomas, A. Trifilieff, M. Barbier, F. Altruda, E. Hirsch, M. Laffargue, *Biochemical Society transactions* **2003**, 31, 275-280.
- [193] L. Rodriguez-Borlado, D. F. Barber, C. Hernandez, M. A. Rodriguez-Marcos, A. Sanchez, E. Hirsch, M. Wymann, C. Martinez, A. C. Carrera, *J Immunol* **2003**, 170, 4475-4482.
- [194] M. Laffargue, R. Calvez, P. Finan, A. Trifilieff, M. Barbier, F. Altruda, E. Hirsch, M. P. Wymann, *Immunity* **2002**, 16, 441-451.
- [195] E. Hirsch, O. Bosco, P. Tropel, M. Laffargue, R. Calvez, F. Altruda, M. P. Wymann, G. Montrucchio, *Faseb J* **2001**, 15, 2019-+.
- [196] E. Hirsch, V. L. Katanaev, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Pirola, L. Silengo, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Altruda, M. P. Wymann, *Science* **2000**, 287, 1049-1053.
- [197] Z. Li, H. P. Jiang, W. Xie, Z. C. Zhang, A. V. Smrcka, D. Q. Wu, *Science* **2000**, 287, 1046-1049.
- [198] T. Sasaki, J. Irie-Sasaki, R. G. Jones, A. J. Oliveira-dos-Santos, W. L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Kozieradzki, N. Joza, T. W. Mak, P. S. Ohashi, A. Suzuki, J. M. Penninger, *Science* **2000**, 287, 1040-1046.

- 
- [199] R. C. Stein, M. D. Waterfield, *Mol Med Today* **2000**, 6, 347-357.
- [200] M. P. Wymann, M. Zvelebil, M. Laffargue, *Trends Pharmacol Sci* **2003**, 24, 366-376.
- [201] S. G. Ward, P. Finan, *Curr Opin Pharmacol* **2003**, 3, 426-434.
- [202] S. Ward, Y. Sotsios, J. Dowden, I. Bruce, P. Finan, *Chem Biol* **2003**, 10, 207-213.
- [203] Z. Johnson, C. A. Power, C. Weiss, F. Rintelen, H. Ji, T. Ruckle, M. Camps, T. N. C. Wells, M. K. Schwarz, A. E. I. Proudfoot, C. Rommel, *Biochemical Society transactions* **2004**, 32, 366-377.
- [204] Z. Y. Bao, Q. W. Ye, W. H. Gong, Y. Xiang, H. Y. Wan, *Int Immunopharmacol* **2010**, 10, 259-263.
- [205] O. Kulkarni, R. D. Pawar, W. Purschke, D. Eulberg, N. Selve, K. Buchner, V. Ninichuk, S. Segerer, V. Vielhauer, S. Klussmann, H. J. Anders, *J Am Soc Nephrol* **2007**, 18, 2350-2358.
- [206] J. Hoellenriegel, D. Zboralski, C. Maasch, N. Y. Rosin, W. G. Wierda, M. J. Keating, A. Kruschinski, J. A. Burger, *Blood* **2014**, 123, 1032-1039.
- [207] M. K. Schwarz, T. N. C. Wells, *Nat Rev Drug Discov* **2002**, 1, 347-358.
- [208] Z. L. Gao, W. A. Metz, *Chem Rev* **2003**, 103, 3733-3752.
- [209] D. Grainger, J. Reckless, V. Piercy, K. Langley, I. Purvis, I. Purvis, D. Fox, *Allergy* **2009**, 64, 539-539.
- [210] R. Bertini, M. Allegretti, C. Bizzarri, A. Moriconi, M. Locati, G. Zampella, M. N. Cervellera, V. Di Cioccio, M. C. Cesta, E. Galliera, F. O. Martinez, R. Di Bitondo, G. Troiani, V. Sabbatini, G. D'Anniballe, R. Anacardio, J. C. Cutrin, B. Cavalieri, F. Mainiero, R. Strippoli, P. Villa, M. Di Girolamo, F. Martin, M. Gentile, A. Santoni, D. Corda, G. Poli, A. Mantovani, P. Ghezzi, F. Colotta, *P Natl Acad Sci USA* **2004**, 101, 11791-11796.
- [211] C. Bizzarri, F. Casilli, A. Bianchini, I. Gloaguen, R. Di Bitondo, M. N. Cervellera, F. Mainiero, B. Cavalieri, F. Colotta, R. Bertini, *Fund Clin Pharmacol* **2004**, 18, 89-89.
- [212] C. Clarke, S. Kuboki, N. Sakai, K. R. Kasten, A. D. Tevar, R. Schuster, J. Blanchard, C. C. Caldwell, M. J. Edwards, A. B. Lentsch, *Hepatology* **2011**, 53, 261-271.
- [213] C. Bizzarri, S. Pagliei, L. Brandolini, P. Mascagni, G. Caselli, P. Transidico, S. Sozzani, R. Bertini, *Biochemical pharmacology* **2001**, 61, 1429-1437.
- [214] S. Paskauskas, A. Parseliunas, V. Kerkadze, R. Nobiling, J. Schmidt, E. Ryschich, *Bmc Immunol* **2011**, 12.
- [215] P. Opfermann, U. Derhaschnig, A. Felli, J. Wenisch, D. Santer, A. Zuckermann, M. Dworschak, B. Jilma, B. Steinlechner, *Clinical and experimental immunology* **2015**, 180, 131-142.

- 
- [216] B. T. Seet, G. McFadden, *J Leukocyte Biol* **2002**, 72, 24-34.
- [217] A. Alcami, S. A. Lira, *Curr Opin Immunol* **2010**, 22, 482-487.
- [218] A. S. Lalani, K. Graham, K. Mossman, K. Rajarathnam, I. ClarkLewis, D. Kelvin, G. McFadden, *Journal of virology* **1997**, 71, 4356-4363.
- [219] A. Frauenschuh, C. A. Power, M. Deruaz, B. R. Ferreira, J. S. Silva, M. M. Teixeira, J. M. Dias, T. Martin, T. N. C. Wells, A. E. I. Proudfoot, *J Biol Chem* **2007**, 282, 27250-27258.
- [220] Y. Alenazi, K. Singh, G. Davies, J. R. O. Eaton, P. Elders, A. Kawamura, S. Bhattacharya, *Sci Rep* **2018**, 8, 6333.
- [221] A. Datta-Mannan, M. J. Stone, *Biochemistry-Us* **2004**, 43, 14602-14611.
- [222] M. Szpakowska, V. Fievez, K. Arumugan, N. van Nuland, J. C. Schmit, A. Chevigne, *Biochemical pharmacology* **2012**, 84, 1366-1380.
- [223] E. J. Miller, A. Kurdowska, S. Nagao, F. K. Carr, S. Hayashi, M. A. L. Atkinson, A. B. Cohen, *Agents Actions* **1993**, 40, 200-208.
- [224] M. R. Attwood, E. A. Conway, R. M. Dunsdon, J. R. Greening, B. K. Handa, P. S. Jones, S. C. Jordan, E. Keech, F. X. Wilson, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **1997**, 7, 429-432.
- [225] M. R. Attwood, N. Borkakoti, G. A. Bottomley, E. A. Conway, I. Cowan, A. G. Fallowfield, B. K. Handa, P. S. Jones, E. Keech, S. J. Kirtland, G. Williams, F. X. Wilson, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **1996**, 6, 1869-1874.
- [226] L. Rajagopalan, K. Rajarathnam, *J Biol Chem* **2004**, 279, 30000-30008.
- [227] D. Helmer, I. Rink, J. A. R. Dalton, K. Brahm, M. Jost, T. M. Nargang, W. Blum, P. Wadhwani, G. Brenner-Weiss, B. E. Rapp, J. Giraldo, K. Schmitz, *Rsc Adv* **2015**, 5, 25657-25668.  
Correction in: *Rsc Adv* **2018**, 8, 16800 - 16801
- [228] L. Agrawal, Z. VanHorn-Ali, E. A. Berger, G. Alkhatib, *Blood* **2004**, 103, 1211-1217.
- [229] K. Mobius, R. Durr, C. Haussner, U. Dietrich, J. Eichler, *Chem-Eur J* **2012**, 18, 8292-8295.
- [230] A. Chevigne, V. Fievez, M. Szpakowska, A. Fischer, M. Counson, J. M. Plessier, J. C. Schmit, S. Deroo, *Bba-Mol Cell Res* **2014**, 1843, 1031-1041.
- [231] A. C. Anderson, *Chem Biol* **2003**, 10, 787-797.
- [232] R. H. Kimura, D. S. Jones, L. Jiang, Z. Miao, Z. Cheng, J. R. Cochran, *Plos One* **2011**, 6.
- [233] E. T. Boder, K. D. Wittrup, *Nat Biotechnol* **1997**, 15, 553-557.

- 
- [234] R. W. Roberts, J. W. Szostak, *P Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*, 12297-12302.
- [235] C. A. Valencia, S. W. Cotten, B. A. Dong, R. H. Liu, *Biotechnol Progr* **2008**, *24*, 561-569.
- [236] K. Hertveldt, T. Belien, G. Volckaert, *Methods in molecular biology* **2009**, *502*, 321-339.
- [237] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315-1317.
- [238] J. Hanes, L. Jeremius, S. Weber-Bornhauser, H. R. Bosshard, A. Pluckthun, *P Natl Acad Sci USA* **1998**, *95*, 14130-14135.
- [239] J. Hanes, A. Pluckthun, *P Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*, 4937-4942.
- [240] P. S. Daugherty, *Curr Opin Struc Biol* **2007**, *17*, 474-480.
- [241] J. Lofblom, *Biotechnol J* **2011**, *6*, 1115-1129.
- [242] C. Neylon, *Nucleic acids research* **2004**, *32*, 1448-1459.
- [243] D. R. Burton, C. F. Barbas, M. A. A. Persson, S. Koenig, R. M. Chanock, R. A. Lerner, *P Natl Acad Sci USA* **1991**, *88*, 10134-10137.
- [244] T. Lindner, H. Kolmar, U. Haberkorn, W. Mier, *Molecules* **2011**, *16*, 1625-1641.
- [245] C. Ezerzer, M. Dolgin, J. Skovorodnikova, N. Harris, *Peptides* **2009**, *30*, 1296-1305.
- [246] M. Houimel, L. Mazzucchelli, *J Leukocyte Biol* **2009**, *85*, 728-738.
- [247] M. Houimel, P. Loetscher, M. Baggiolini, L. Mazzucchelli, *Eur J Immunol* **2001**, *31*, 3535-3545.
- [248] R. Freudl, S. Macintyre, M. Degen, U. Henning, *Journal of molecular biology* **1986**, *188*, 491-494.
- [249] K. Singh, G. Davies, Y. Alenazi, J. R. O. Eaton, A. Kawamura, S. Bhattacharya, *Sci Rep* **2017**, *7*, 4267.
- [250] B. H. Hu, M. R. Jones, P. B. Messersmith, *Anal Chem* **2007**, *79*, 7275-7285.
- [251] J. M. Astle, L. S. Simpson, Y. Huang, M. M. Reddy, R. Wilson, S. Connell, J. Wilson, T. Kodadek, *Chem Biol* **2010**, *17*, 38-45.
- [252] H. S. Lim, M. M. Reddy, X. S. Xiao, J. Wilson, R. Wilson, S. Connell, T. Kodadek, *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 3866-3869.
- [253] S. Ostergaard, A. Holm, *Mol Divers* **1997**, *3*, 17-27.

- 
- [254] G. M. Figliozzi, R. Goldsmith, S. C. Ng, S. C. Banville, R. N. Zuckermann, *Combinatorial Chemistry* **1996**, 267, 437-447.
- [255] N. Heine, T. Ast, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, L. Germeroth, H. Wenschuh, *Tetrahedron* **2003**, 59, 9919-9930.
- [256] R. VolkmerEngert, B. Hoffmann, J. SchneiderMergener, *Tetrahedron Lett* **1997**, 38, 1029-1032.
- [257] T. Kodadek, K. Bachhawat-Sikder, *Mol Biosyst* **2006**, 2, 25-35.
- [258] M. Humet, T. Carbonell, I. Masip, F. Sanchez-Baeza, P. Mora, E. Canton, M. Gobernado, C. Abad, E. Perez-Paya, A. Messeguer, *J Comb Chem* **2003**, 5, 597-605.
- [259] K. Mendes, J. M. Ndungu, L. F. Clark, T. Kodadek, *Acs Comb Sci* **2015**, 17, 506-517.
- [260] M. A. Clark, R. A. Acharya, C. C. Arico-Muendel, S. L. Belyanskaya, D. R. Benjamin, N. R. Carlson, P. A. Centrella, C. H. Chiu, S. P. Creaser, J. W. Cuzzo, C. P. Davie, Y. Ding, G. J. Franklin, K. D. Franzen, M. L. Gefter, S. P. Hale, N. J. V. Hansen, D. I. Israel, J. W. Jiang, M. J. Kavarana, M. S. Kelley, C. S. Kollmann, F. Li, K. Lind, S. Mataruse, P. F. Medeiros, J. A. Messer, P. Myers, H. O'Keefe, M. C. Oliff, C. E. Rise, A. L. Satz, S. R. Skinner, J. L. Svendsen, L. J. Tang, K. van Vloten, R. W. Wagner, G. Yao, B. G. Zhao, B. A. Morgan, *Nat Chem Biol* **2009**, 5, 647-654.
- [261] G. Evindar, R. A. Acharya, C. Arico-Muendel, S. Belyanskaya, J. Brown, M. A. Clark, P. A. Centrella, J. W. Cuzzo, C. P. Davie, Y. Ding, J. J. Franklin, J. W. Gross, D. I. Israel, L. J. Jolivet, A. J. Jurewicz, A. S. Lakdawala, F. Li, H. Li, K. E. Lind, J. P. Marino, B. Morgan, J. A. Messer, T. J. Roethke, K. I. Sargent, L. M. Shewchuk, S. R. Skinner, J. L. Svendsen, W. S. Xie, H. F. Yang, *Abstr Pap Am Chem S* **2009**, 238.
- [262] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, 354, 84-86.
- [263] S. Hayashi, A. Kurdowska, E. J. Miller, M. E. Albright, B. E. Girtten, A. B. Cohen, *J Immunol* **1995**, 154, 814-824.
- [264] S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, W. H. Moos, *Drug Develop Res* **1995**, 35, 20-32.
- [265] S. Hayashi, A. Kurdowska, A. B. Cohen, M. D. Stevens, N. Fujisawa, E. J. Miller, *J Clin Invest* **1997**, 99, 2581-2587.
- [266] S. Hayashi, J. Yatsunami, Y. Fukuno, M. Kawashima, E. J. Miller, *Lung* **2002**, 180, 339-348.
- [267] P. S. Farmer, E. J. Ariens, *Trends Pharmacol Sci* **1982**, 3, 362-365.
- [268] J. Vagner, H. C. Qu, V. J. Hruby, *Curr Opin Chem Biol* **2008**, 12, 292-296.
- [269] A. Grauer, B. Konig, *Eur J Org Chem* **2009**, 5099-5111.

- 
- [270] R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, D. C. Spellmeyer, R. Y. Tan, A. D. Frankel, D. V. Santi, F. E. Cohen, P. A. Bartlett, *P Natl Acad Sci USA* **1992**, 89, 9367-9371.
- [271] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 10646-10647.
- [272] E. W. Taylor, J. A. Gibbons, R. A. Braeckman, *Pharmaceut Res* **1997**, 14, 572-577.
- [273] G. L. Butterfoss, P. D. Renfrew, B. Kuhlman, K. Kirshenbaum, R. Bonneau, *J Am Chem Soc* **2009**, 131, 16798-16807.
- [274] Q. Sui, D. Borchardt, D. L. Rabenstein, *J Am Chem Soc* **2007**, 129, 12042-12048.
- [275] K. Moehle, H. J. Hofmann, *Biopolymers* **1996**, 38, 781-790.
- [276] R. N. Zuckermann, *Abstr Pap Am Chem S* **1994**, 208, 376-POLY.
- [277] I. Masip, N. Cortes, M. J. Abad, M. Guardiola, E. Perez-Paya, J. Ferragut, A. Ferrer-Montiel, A. Messegue, *Bioorgan Med Chem* **2005**, 13, 1923-1929.
- [278] K. Fickentscher, *Archiv Pharm Bericht* **1969**, 302, 119-+.
- [279] D. Buckley, S. Dunstan, H. B. Henbest, *J Chem Soc* **1957**, 4901-4905.
- [280] T. Schroder, N. Niemeier, S. Afonin, A. S. Ulrich, H. F. Krug, S. Brase, *Journal of medicinal chemistry* **2008**, 51, 376-379.
- [281] I. Peretto, R. M. Sanchez-Martin, X. H. Wang, J. Ellard, S. Mittoo, M. Bradley, *Chem Commun* **2003**, 2312-2313.
- [282] S. Ng, B. Goodson, A. Ehrhardt, W. H. Moos, M. Siani, J. Winter, *Bioorgan Med Chem* **1999**, 7, 1781-1785.
- [283] A. R. Statz, A. E. Barron, P. B. Messersmith, *Soft Matter* **2008**, 4, 131-139.
- [284] N. P. Chongsiriwatana, J. A. Patch, A. M. Czyzewski, M. T. Dohm, A. Ivankin, D. Gidalevitz, R. N. Zuckermann, A. E. Barron, *P Natl Acad Sci USA* **2008**, 105, 2794-2799.
- [285] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *P Natl Acad Sci USA* **2000**, 97, 13003-13008.
- [286] D. E. Stewart, A. Sarkar, J. E. Wampler, *Journal of molecular biology* **1990**, 214, 253-260.
- [287] K. Kirshenbaum, A. E. Barron, R. A. Goldsmith, P. Armand, E. K. Bradley, K. T. V. Truong, K. A. Dill, F. E. Cohen, R. N. Zuckermann, *P Natl Acad Sci USA* **1998**, 95, 4303-4308.

- 
- [288] P. Armand, K. Kirshenbaum, R. A. Goldsmith, S. Farr-Jones, A. E. Barron, K. T. V. Truong, K. A. Dill, D. F. Mierke, F. E. Cohen, R. N. Zuckermann, E. K. Bradley, *P Natl Acad Sci USA* **1998**, *95*, 4309-4314.
- [289] M. Rainaldi, V. Moretto, M. Crisma, E. Peggion, S. Mammi, C. Toniolo, G. Cavicchioni, *J Pept Sci* **2002**, *8*, 241-252.
- [290] P. Armand, K. Kirshenbaum, A. Falicov, R. L. Dunbrack, K. A. Dill, R. N. Zuckermann, F. E. Cohen, *Fold Des* **1997**, *2*, 369-375.
- [291] Y. B. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *Biopolymers* **1996**, *39*, 859-872.
- [292] T. J. Sanborn, C. W. Wu, R. N. Zuckerman, A. E. Barron, *Biopolymers* **2002**, *63*, 12-20.
- [293] B. Sanii, R. Kudirka, A. Cho, N. Venkateswaran, G. K. Olivier, A. M. Olson, H. Tran, R. M. Harada, L. Tan, R. N. Zuckermann, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 20808-20815.
- [294] J. A. Crapster, I. A. Guzei, H. E. Blackwell, *Angew Chem Int Edit* **2013**, *52*, 5079-5084.
- [295] B. C. Lee, T. K. Chu, K. A. Dill, R. N. Zuckermann, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 8847-8855.
- [296] B. C. Lee, R. N. Zuckermann, K. A. Dill, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 10999-11009.
- [297] C. Anne, M. C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques, F. Cornille, *Tetrahedron Lett* **1998**, *39*, 8973-8974.
- [298] T. A. Tran, R. H. Mattern, M. Afargan, O. Amitay, O. Ziv, B. A. Morgan, J. E. Taylor, D. Hoyer, M. Goodman, *Journal of medicinal chemistry* **1998**, *41*, 2679-2685.
- [299] J. J. Devlin, L. C. Panganiban, P. E. Devlin, *Science* **1990**, *249*, 404-406.
- [300] P. C. Weber, M. W. Pantoliano, L. D. Thompson, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9350-9354.
- [301] R. B. Merrifield, *J Am Chem Soc* **1963**, *85*, 2149-&.
- [302] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *International journal of peptide and protein research* **1991**, *37*, 487-493.
- [303] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- [304] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 411-448.
- [305] A. Thakkar, A. S. Cohen, M. D. Connolly, R. N. Zuckermann, D. Pei, *J Comb Chem* **2009**, *11*, 294-302.
- [306] B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. H. Kent, *Science* **1993**, *262*, 89-92.



- 
- [307] S. H. Hwang, A. Lehman, X. Cong, M. M. Olmstead, K. S. Lam, C. B. Lebrilla, M. J. Kurth, *Organic letters* **2004**, 6, 3829-3832.
- [308] R. Liu, J. Marik, K. S. Lam, *J Am Chem Soc* **2002**, 124, 7678-7680.
- [309] M. G. Paulick, K. M. Hart, K. M. Brinner, M. Tjandra, D. H. Charych, R. N. Zuckermann, *J Comb Chem* **2006**, 8, 417-426.
- [310] W. Heerma, C. Versluis, C. G. deKoster, J. A. W. Kruijtzter, I. Zigrovic, R. M. J. Liskamp, *Rapid Commun Mass Sp* **1996**, 10, 459-464.
- [311] W. Heerma, J. P. J. L. Boon, C. Versluis, J. A. W. Kruijtzter, L. J. F. Hofmeyer, R. M. J. Liskamp, *J Mass Spectrom* **1997**, 32, 697-704.
- [312] B. H. Willi Bannwarth, *Combinatorial Chemistry, Vol. 26*, Wiley-VCH, **2005**.
- [313] E. M. Southern, *Methods in molecular biology* **2001**, 170, 1-15.
- [314] F. C. Kafatos, C. W. Jones, A. Efstratiadis, *Nucleic acids research* **1979**, 7, 1541-1552.
- [315] J. D. Hoheisel, M. T. Ross, G. Zehetner, H. Lehrach, *J Biotechnol* **1994**, 35, 121-134.
- [316] J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. J. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate Chem* **2001**, 12, 346-353.
- [317] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J Am Chem Soc* **1999**, 121, 7967-7968.
- [318] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* **1995**, 270, 467-470.
- [319] E. M. Southern, U. Maskos, J. K. Elder, *Genomics* **1992**, 13, 1008-1017.
- [320] A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, *Biosens Bioelectron* **1996**, 11, 687-690.
- [321] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *P Natl Acad Sci-Biol* **1984**, 81, 3998-4002.
- [322] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, 48, 9217-9232.
- [323] S. P. A. Fodor, R. P. Rava, X. H. C. Huang, A. C. Pease, C. P. Holmes, C. L. Adams, *Nature* **1993**, 364, 555-556.
- [324] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767-773.
- [325] M. Beyer, A. Nesterov, I. Block, K. Konig, T. Felgenhauer, S. Fernandez, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, U. Trunk, V. Lindenstruth, F. R. Bischoff, V. Stadler, F. Breitling, *Science* **2007**, 318, 1888-1888.

- 
- [326] V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Guttler, M. Groning, K. Konig, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff, F. Breitling, *Angew Chem Int Edit* **2008**, *47*, 7132-7135.
- [327] R. A. Houghten, *P Natl Acad Sci USA* **1985**, *82*, 5131-5135.
- [328] M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *P Natl Acad Sci USA* **1993**, *90*, 10700-10704.
- [329] M. Oh, J. H. Lee, W. Wang, H. S. Lee, W. S. Lee, C. Burlak, W. Im, Q. Q. Hoang, H. S. Lim, *P Natl Acad Sci USA* **2014**, *111*, 11007-11012.
- [330] K. C. Nicolaou, X. Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, M. P. Nova, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1995**, *34*, 2289-2291.
- [331] H. M. Geysen, C. D. Wagner, W. M. Bodnar, C. J. Markworth, G. J. Parke, F. J. Schoenen, D. S. Wagner, D. S. Kinder, *Chem Biol* **1996**, *3*, 679-688.
- [332] D. Wiese, K. Schmitz, *Journal of immunological methods* **2011**, *364*, 77-82.
- [333] J. Inglese, P. Samama, S. Patel, J. Burbaum, I. L. Stroke, K. C. Appell, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2372-2377.
- [334] S. Boyden, *J Exp Med* **1962**, *115*, 453-&.
- [335] I. Rink, Dissertation thesis, TU Darmstadt (Darmstadt), **2016**.
- [336] S. Eckes, Master Thesis thesis, TU Darmstadt (Darmstadt), **2016**.
- [337] P. Wiegand, Master Thesis thesis, TU Darmstadt **2017**.
- [338] K. Brahm, J. S. Wack, S. Eckes, V. Engemann, K. Schmitz, *Biopolymers* **2019**, *110*, e23244.
- [339] J. Sarmiento, C. Shumate, K. Suetomi, A. Ravindran, L. Villegas, K. Rajarathnam, J. Navarro, *PLoS One* **2011**, *6*, e27967.
- [340] P. R. Joseph, J. M. Sarmiento, A. K. Mishra, S. T. Das, R. P. Garofalo, J. Navarro, K. Rajarathnam, *J Biol Chem* **2010**, *285*, 29262-29269.
- [341] I. Clark-Lewis, K. S. Kim, K. Rajarathnam, J. H. Gong, B. Dewald, B. Moser, M. Baggiolini, B. D. Sykes, *J Leukoc Biol* **1995**, *57*, 703-711.
- [342] L. Rajagopalan, K. Rajarathnam, *Bioscience reports* **2006**, *26*, 325-339.
- [343] K. M. Misura, D. Chivian, C. A. Rohl, D. E. Kim, D. Baker, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 5361-5366.

- 
- [344] R. T. Clubb, J. G. Omichinski, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Febs Lett* **1994**, 338, 93-97.
- [345] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int J Pept Prot Res* **1990**, 35, 161-214.
- [346] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Annual review of biochemistry* **1978**, 47, 251-276.
- [347] B. Rost, G. Yachdav, J. Liu, *Nucleic acids research* **2004**, 32, W321-326.
- [348] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry-Us* **1974**, 13, 222-245.
- [349] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry-Us* **1974**, 13, 211-222.
- [350] E. N. Baker, R. E. Hubbard, *Progress in biophysics and molecular biology* **1984**, 44, 97-179.
- [351] I. Y. Torshin, I. T. Weber, R. W. Harrison, *Protein engineering* **2002**, 15, 359-363.
- [352] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *Journal of medicinal chemistry* **2010**, 53, 5061-5084.
- [353] J. T. Nguyen, M. Porter, M. Amoui, W. T. Miller, R. N. Zuckermann, W. A. Lim, *Chemistry & biology* **2000**, 7, 463-473.
- [354] J. Zimmermann, R. Kuhne, R. Volkmer-Engert, T. Jarchau, U. Walter, H. Oschkinat, L. J. Ball, *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, 36810-36818.
- [355] E. C. de Haan, M. H. Wauben, M. C. Grosfeld-Stulemeyer, J. A. Kruijtz, R. M. Liskamp, E. E. Moret, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2002**, 10, 1939-1945.
- [356] B. Yoo, S. B. Y. Shin, M. L. Huang, K. Kirshenbaum, *Chem-Eur J* **2010**, 16, 5528-5537.
- [357] T. A. F. Cardote, A. Ciulli, *Chemmedchem* **2016**, 11, 787-794.
- [358] K. Chandra, T. K. Roy, D. E. Shalev, A. Loyter, C. Gilon, R. B. Gerber, A. Friedler, *Angewandte Chemie* **2014**, 53, 9450-9455.
- [359] W. D. Fairlie, P. G. Stanton, M. T. Hearn, *European journal of biochemistry / FEBS* **1995**, 228, 373-380.
- [360] S. M. Cowell, Y. S. Lee, J. P. Cain, V. J. Hruby, *Current medicinal chemistry* **2004**, 11, 2785-2798.
- [361] R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M. Ihara, H. Takagi, T. Hohsaka, H. Ueda, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 17386-17394.
- [362] H.-J. Jeong, Y. Ohmuro-Matsuyama, H. Ohashi, F. Ohsawa, Y. Tatsu, M. Inagaki, H. Ueda, *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, 40, 17-23.

- 
- [363] H. Ohashi, T. Matsumoto, H.-J. Jeong, J. Dong, R. Abe, H. Ueda, *Bioconjugate chemistry* **2016**, *27*, 2248-2253.
- [364] R. W. Cheloha, A. Maeda, T. Dean, T. J. Gardella, S. H. Gellman, *Nature biotechnology* **2014**, *32*, 653-655.
- [365] S. C. Penchala, M. R. Miller, A. Pal, J. Dong, N. R. Madadi, J. Xie, H. Joo, J. Tsai, P. Batoon, V. Samoshin, A. Franz, T. Cox, J. Miles, W. K. Chan, M. S. Park, M. M. Alhamadsheh, *Nature chemical biology* **2015**, *11*, 793-798.
- [366] D. S. Nielsen, H. N. Hoang, R. J. Lohman, T. A. Hill, A. J. Lucke, D. J. Craik, D. J. Edmonds, D. A. Griffith, C. J. Rotter, R. B. Ruggeri, D. A. Price, S. Liras, D. P. Fairlie, *Angewandte Chemie* **2014**, *53*, 12059-12063.
- [367] D. S. Nielsen, R. J. Lohman, H. N. Hoang, T. A. Hill, A. Jones, A. J. Lucke, D. P. Fairlie, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2015**, *16*, 2289-2293.
- [368] T. A. Hill, R. J. Lohman, H. N. Hoang, D. S. Nielsen, C. C. Scully, W. M. Kok, L. Liu, A. J. Lucke, M. J. Stoermer, C. I. Schroeder, S. Chaousis, B. Colless, P. V. Bernhardt, D. J. Edmonds, D. A. Griffith, C. J. Rotter, R. B. Ruggeri, D. A. Price, S. Liras, D. J. Craik, D. P. Fairlie, *ACS medicinal chemistry letters* **2014**, *5*, 1148-1151.
- [369] S. Monroc, E. Badosa, L. Feliu, M. Planas, E. Montesinos, E. Bardaji, *Peptides* **2006**, *27*, 2567-2574.
- [370] H. S. Ahn, W. Cho, J. M. Kim, B. P. Joshi, J. W. Park, C. R. Lohani, H. Cho, K. H. Lee, *Bioorgan Med Chem* **2008**, *16*, 4127-4137.
- [371] E. M. Molhoek, A. van Dijk, E. J. A. Veldhuizen, H. P. Haagsman, F. J. Bikker, *Peptides* **2011**, *32*, 875-880.
- [372] F. Reichart, M. Horn, I. Neundorff, *J Pept Sci* **2016**, *22*, 421-426.
- [373] M. Horn, F. Reichart, S. Natividad-Tietz, D. Diaz, I. Neundorff, *Chem Commun* **2016**, *52*, 2261-2264.
- [374] R. J. Clark, H. Fischer, L. Dempster, N. L. Daly, K. J. Rosengren, S. T. Nevin, F. A. Meunier, D. J. Adams, D. J. Craik, *P Natl Acad Sci USA* **2005**, *102*, 13767-13772.
- [375] C. Adessi, C. Soto, *Curr Med Chem* **2002**, *9*, 963-978.
- [376] R. J. Clark, J. Jensen, S. T. Nevin, B. P. Callaghan, D. J. Adams, D. J. Craik, *Angew Chem Int Edit* **2010**, *49*, 6545-6548.
- [377] L. Y. Chan, V. M. Zhang, Y. H. Huang, N. C. Waters, P. S. Bansal, D. J. Craik, N. L. Daly, *Chembiochem* **2013**, *14*, 617-624.

- 
- [378] K. S. Harris, T. Durek, Q. Kaas, A. G. Poth, E. K. Gilding, B. F. Conlan, I. Saska, N. L. Daly, N. L. van der Weerden, D. J. Craik, M. A. Anderson, *Nat Commun* **2015**, *6*.
- [379] K. Osapay, D. Tran, A. S. Ladokhin, S. H. White, A. H. Henschen, M. E. Selsted, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 12017-12022.
- [380] A. Rozek, J. P. S. Powers, C. L. Friedrich, R. E. W. Hancock, *Biochemistry-Us* **2003**, *42*, 14130-14138.
- [381] T. Liu, Z. Q. Qian, Q. Xiao, D. H. Pei, *Acs Comb Sci* **2011**, *13*, 537-546.
- [382] K. S. Lam, R. W. Liu, S. Miyamoto, A. L. Lehman, J. M. Tuscano, *Accounts Chem Res* **2003**, *36*, 370-377.
- [383] K. S. Lam, A. L. Lehman, A. M. Song, N. Doan, A. M. Enstrom, J. Maxwell, R. W. Liu, *Method Enzymol* **2003**, *369*, 298-322.
- [384] M. Meldal, *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8*, 238-244.
- [385] X. W. Chen, P. H. Tan, Y. Y. Zhang, D. H. Pei, *J Comb Chem* **2009**, *11*, 604-611.
- [386] H. G. Baek, R. W. Liu, K. S. Lam, *J Comb Chem* **2009**, *11*, 91-102.
- [387] J. Blummel, N. Perschmann, D. Aydin, J. Drinjakovic, T. Surrey, M. Lopez-Garcia, H. Kessler, J. P. Spatz, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4739-4747.
- [388] M. Pursch, G. Schlotterbeck, L. H. Tseng, K. Albert, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1996**, *35*, 2867-2869.
- [389] H. I. Olivos, K. Bachhawat-Sikder, T. Kodadek, *Chembiochem* **2003**, *4*, 1242-1245.
- [390] H. J. Olivos, K. Bachhawat-Sikder, T. J. Kodadek, *Abstr Pap Am Chem S* **2003**, *226*, U185-U185.
- [391] M. Hintersteiner, M. Auer, *Methods and Applications in Fluorescence* **2013**, *1*.
- [392] T. M. Doran, Y. Gao, K. Mendes, S. Dean, S. Simanski, T. Kodadek, *Acs Comb Sci* **2014**, *16*, 259-270.
- [393] J. K. Bowmaker, H. J. A. Dartnall, *J Physiol-London* **1980**, *298*, 501-511.
- [394] T. Lamla, V. A. Erdmann, *Protein expression and purification* **2004**, *33*, 39-47.
- [395] T. Lamla, V. A. Erdmann, *Journal of molecular biology* **2003**, *329*, 381-388.
- [396] T. G. M. Schmidt, J. Koepke, R. Frank, A. Skerra, *Journal of molecular biology* **1996**, *255*, 753-766.

- 
- [397] J. S. Wack, Master Thesis thesis, TU Darmstadt (Darmstadt), **2015**.
- [398] K. Brahm, Master Thesis thesis, TU Darmstadt (Darmstadt), **2013**.
- [399] M. Joest, Dissertation thesis, TU Darmstadt (Darmstadt), **2016**.
- [400] K. J. Lee, H. S. Lim, *Organic letters* **2014**, *16*, 5710-5713.
- [401] Y. U. Kwon, T. Kodadek, *Chem Commun (Camb)* **2008**, 5704-5706.
- [402] J. H. Kim, H. Kang, S. Kim, B. H. Jun, T. Kang, J. Chae, S. Jeong, J. Kim, D. H. Jeong, Y. S. Lee, *Chem Commun* **2011**, *47*, 2306-2308.
- [403] P. Wipf, *Chem Rev* **1995**, *95*, 2115-2134.
- [404] R. Fasan, R. L. A. Dias, K. Moehle, O. Zerbe, J. W. Vrijbloed, D. Obrecht, J. A. Robinson, *Angew Chem Int Edit* **2004**, *43*, 2109-2112.
- [405] D. Y. Wang, W. Liao, P. S. Arora, *Angew Chem Int Edit* **2005**, *44*, 6525-6529.
- [406] J. Rizo, L. M. Gierasch, *Annual review of biochemistry* **1992**, *61*, 387-418.
- [407] J. Blankenstein, J. P. Zhu, *Eur J Org Chem* **2005**, 1949-1964.
- [408] C. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine, *J Am Chem Soc* **2000**, *122*, 5891-5892.
- [409] J. S. Davies, *J Pept Sci* **2003**, *9*, 471-501.
- [410] J. D. Hartgerink, J. R. Granja, R. A. Milligan, M. R. Ghadiri, *J Am Chem Soc* **1996**, *118*, 43-50.
- [411] D. A. Horton, G. T. Bourne, M. L. Smythe, *Mol Divers* **2000**, *5*, 289-304.
- [412] D. P. Fairlie, G. Abbenante, D. R. March, *Curr Med Chem* **1995**, *2*, 654-686.
- [413] P. Li, P. P. Roller, J. C. Xu, *Curr Org Chem* **2002**, *6*, 411-440.
- [414] A. G. Barrett, A. J. Hennessy, R. Le Vezouet, P. A. Procopiu, P. W. Seale, S. Stefaniak, R. J. Upton, A. J. White, D. J. Williams, *The Journal of organic chemistry* **2004**, *69*, 1028-1037.
- [415] J. Becerril, M. Bolte, M. I. Burguete, F. Galindo, E. Garcia-Espana, S. V. Luis, J. F. Miravet, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 6677-6686.
- [416] Y. Che, G. R. Marshall, *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 111-124.

- 
- [417] T. Passioura, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, *Annual Review of Biochemistry*, Vol 83 **2014**, 83, 727-752.
- [418] S. B. Shin, B. Yoo, L. J. Todaro, K. Kirshenbaum, *J Am Chem Soc* **2007**, 129, 3218-3225.
- [419] S. B. L. Vollrath, C. H. Hu, S. Brase, K. Kirshenbaum, *Chem Commun* **2013**, 49, 2317-2319.
- [420] A. S. Culf, M. Cuperlovic-Culf, D. A. Leger, A. Decken, *Organic letters* **2014**, 16, 2780-2783.
- [421] S. N. Khan, A. Kim, R. H. Grubbs, Y. U. Kwon, *Organic letters* **2011**, 13, 1582-1585.
- [422] V. Goncalves, B. Gautier, A. Regazzetti, P. Coric, S. Bouaziz, C. Garbay, M. Vidal, N. Inguimbert, *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 5590-5594.
- [423] R. A. Turner, A. G. Oliver, R. S. Lokey, *Organic letters* **2007**, 9, 5011-5014.
- [424] M. Oh, J. H. Lee, H. Moon, Y. J. Hyun, H. S. Lim, *Angewandte Chemie-International Edition* **2016**, 55, 602-606.
- [425] P. J. Kaniraj, G. Maayan, *Organic Letters* **2015**, 17, 2110-2113.
- [426] S. A. Fowler, D. M. Stacy, H. E. Blackwell, *Organic letters* **2008**, 10, 2329-2332.
- [427] S. W. Millward, S. Fiacco, R. J. Austin, R. W. Roberts, *Acs Chem Biol* **2007**, 2, 625-634.
- [428] M. M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, T. Kodadek, *Chemistry & Biology* **2004**, 11, 1127-1137.
- [429] C. W. West, M. A. Estiarte, D. H. Rich, *Organic letters* **2001**, 3, 1205-1208.
- [430] A. M. Birch, F. W. Goldberg, A. Leach, Google Patents, **2011**.
- [431] P. M. Holstein, D. Dallier, J. Vantourout, J. Shaya, A. Millet, O. Baudoin, *Angew Chem Int Edit* **2016**, 55, 2805-2809.
- [432] S. M. Hickey, T. D. Ashton, S. K. Khosa, F. M. Pfeffer, *Synlett* **2012**, 1779-1782.
- [433] T. Fushimi, H. R. Allcock, *Dalton transactions* **2010**, 39, 5349-5355.
- [434] N. Y. Yount, A. J. Waring, K. D. Gank, W. H. Welch, D. Kupferwasser, M. R. Yeaman, *Bba-Biomembranes* **2007**, 1768, 598-608.
- [435] R. Fischer, O. Mader, G. Jung, R. Brock, *Bioconjugate chemistry* **2003**, 14, 653-660.
- [436] M. V. Kvach, I. A. Stepanova, I. A. Prokhorenko, A. P. Stupak, D. A. Bolibrukh, V. A. Korshun, V. V. Shmanai, *Bioconjugate chemistry* **2009**, 20, 1673-1682.



- 
- [437] P. Hoogerhout, K. J. Stittelaar, H. F. Brugghe, J. A. M. Timmermans, G. J. ten Hove, W. Jiskoot, J. H. G. Hoekman, P. J. M. Roholl, *J Pept Res* **1999**, *54*, 436-443.
- [438] C. Vita, E. Drakopoulou, J. Vizzavona, S. Rochette, L. Martin, A. Menez, C. Roumestand, Y. S. Yang, L. Ylisastigui, A. Benjouad, J. C. Gluckman, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 13091-13096.
- [439] A. Datta, M. J. Stone, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2003**, *12*, 2482-2491.
- [440] J. Meier, K. Kassler, H. Sticht, J. Eichler, *Beilstein journal of organic chemistry* **2012**, *8*, 1858-1866.
- [441] A. Zorzi, K. Deyle, C. Heinis, *Current opinion in chemical biology* **2017**, *38*, 24-29.
- [442] P. R. Joseph, K. M. Poluri, P. Gangavarapu, L. Rajagopalan, S. Raghuwanshi, R. M. Richardson, R. P. Garofalo, K. Rajarathnam, *Biophysical journal* **2013**, *105*, 1491-1501.
- [443] G. Williams, N. Borkakoti, G. A. Bottomley, I. Cowan, A. G. Fallowfield, P. S. Jones, S. J. Kirtland, G. J. Price, L. Price, *The Journal of biological chemistry* **1996**, *271*, 9579-9586.
- [444] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- [445] P. G. Alluri, M. M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, H. J. Olivos, T. Kodadek, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13995-14004.
- [446] M. A. Walling, J. A. Novak, J. R. Shepard, *International journal of molecular sciences* **2009**, *10*, 441-491.
- [447] M. Hintersteiner, C. Buehler, V. Uhl, M. Schmied, J. Muller, K. Kottig, M. Auer, *Journal of combinatorial chemistry* **2009**, *11*, 886-894.
- [448] P. C. Weber, M. W. Pantoliano, L. D. Thompson, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9350-9354.
- [449] X. Chen, P. H. Tan, Y. Zhang, D. Pei, *Journal of combinatorial chemistry* **2009**, *11*, 604-611.
- [450] M. Baskin, L. Panz, G. Maayan, *Chemical communications* **2016**, *52*, 10350-10353.
- [451] M. Girrbach, I. Meliciani, B. Waterkotte, S. Berthold, A. Oster, F. Brurein, T. Strunk, P. Wadhwani, S. Berensmeier, W. Wenzel, K. Schmitz, *Phys Chem Chem Phys* **2014**, *16*, 8036-8043.
- [452] M. L. Huang, M. A. Benson, S. B. Y. Shin, V. J. Torres, K. Kirshenbaum, *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013*, 3560-3566.
- [453] N. Maulucci, I. Izzo, G. Bifulco, A. Aliberti, C. De Cola, D. Comegna, C. Gaeta, A. Napolitano, C. Pizza, C. Tedesco, D. Flot, F. De Riccardis, *Chemical communications* **2008**, 3927-3929.

- 
- [454] A. D'Amato, R. Schettini, G. Della Sala, C. Costabile, C. Tedesco, I. Izzo, F. De Riccardis, *Organic & biomolecular chemistry* **2017**, *15*, 9932-9942.
- [455] R. N. Murugan, J. E. Park, D. Lim, M. Ahn, C. Cheong, T. Kwon, K. Y. Nam, S. H. Choi, B. Y. Kim, D. Y. Yoon, M. B. Yaffe, D. Y. Yu, K. S. Lee, J. K. Bang, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2013**, *21*, 2623-2634.
- [456] J. H. Lee, A. M. Meyer, H. S. Lim, *Chemical communications* **2010**, *46*, 8615-8617.
- [457] H. Wiggins, J. Rappoport, *BioTechniques* **2010**, *48*, 121-124.
- [458] M. Gude, J. Ryf, P. D. White, *Lett Pept Sci* **2002**, *9*, 203-206.
- [459] H. Fittler, A. Depp, O. Avrutina, S. O. Dahms, M. E. Than, M. Empting, H. Kolmar, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2015**, *16*, 2441-2444.
- [460] X. Z. Jiang, M. Ahmed, Z. C. Deng, R. Narain, *Bioconjugate chemistry* **2009**, *20*, 994-1001.
- [461] M. Yokoyama, S. Yoshida, T. Imamoto, *Synthesis-Stuttgart* **1982**, 591-592.
- [462] H. B. Jeon, Y. Jang, *Biochemical and biophysical research communications* **2010**, *403*, 442-446.
- [463] G. B. Fields, R. L. Noble, *International journal of peptide and protein research* **1990**, *35*, 161-214.
- [464] M. Perbandt, O. Bruns, M. Vallazza, T. Lamla, C. Betzel, V. A. Erdmann, *Proteins* **2007**, *67*, 1147-1153.
- [465] B. Webb, A. Sali, *Current protocols in bioinformatics* **2016**, *54*, 5 6 1-5 6 37.
- [466] K. B. Koziara, M. Stroet, A. K. Malde, A. E. Mark, *J Comput Aid Mol Des* **2014**, *28*, 221-233.
- [467] S. Pronk, S. Pall, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, *Bioinformatics* **2013**, *29*, 845-854.
- [468] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Vangunsteren, A. Dinola, J. R. Haak, *J Chem Phys* **1984**, *81*, 3684-3690.
- [469] M. Parrinello, A. Rahman, *Phys Rev Lett* **1980**, *45*, 1196-1199.

## 8 Anhang

### 8.1. Chemokinexpression und -Charakterisierung

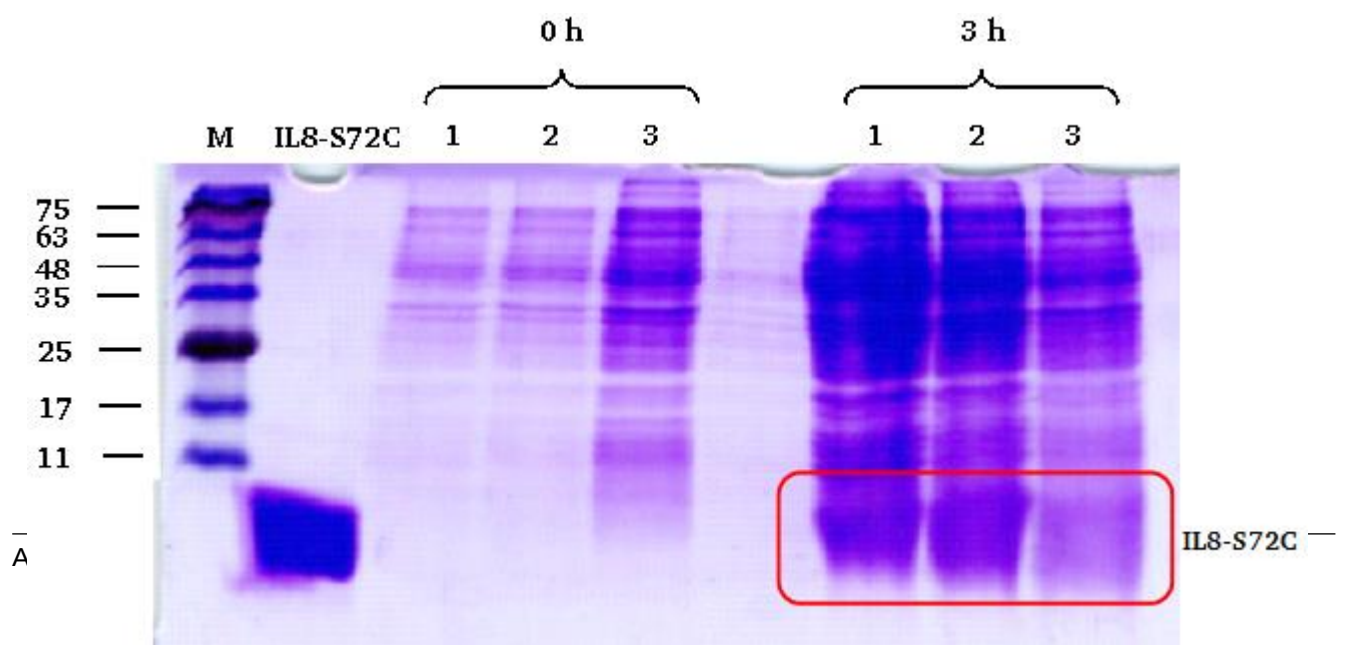


Abbildung 8.1: Exemplarische SDS-PAGE für den Expressionsverlauf von CXCL8S72C 2 in *E. coli* BL21 (DE3) RIL mit pET-22b-IL8-S72C Plasmid. Es wurden Zellsuspensionsproben von drei Expressionsansätze aufgetragen, die vor der Induktion und 3 h nach der Induktion der Expression gezogen wurden. Als Kontrolle wurde eine Probe von CXCL8S72C aufgetragen. Die Expressionsbanden von CXCL8S72C 2 in den Zellsuspensionen sind in rot hervorgehoben.

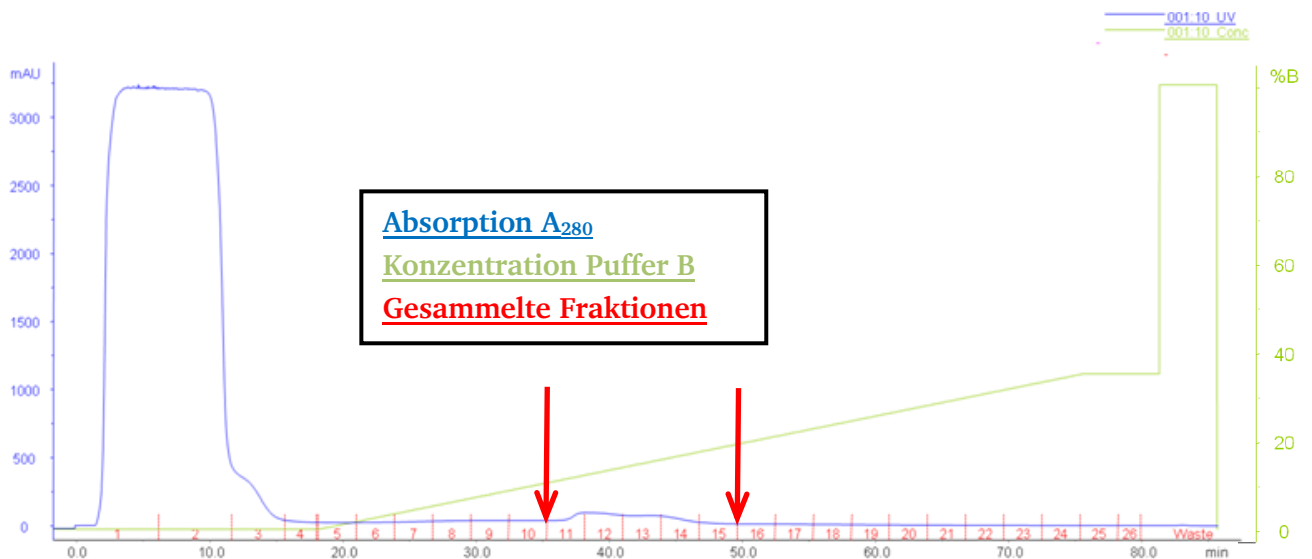


Abbildung 8.2: Exemplarisches Chromatogramm der Reinigung von CXCL8S72C 2 mittels Kationenaustauschchromatographie. Die Absorption bei 280 nm (blau) wurde verfolgt und automatisiert Fraktionen des Eluats gesammelt. Mit steigender Konzentration im Puffer B Gradienten (grün) werden kationische Proteine eluiert. Die Fraktionen 11-15 wurden für die weitere Reinigung gesammelt und sind hervorgehoben (rote Pfeile).

## 8.2. Bindungsaffinität von CXCR1-p1 15 Mutanten (vgl. Kapitel 4.2.1)

Mutanten 17-23 von CXCR1-p1 15 wurden durch Fluoreszenzanisotropiemessungen auf ihre Affinität zu CXCL8 untersucht.

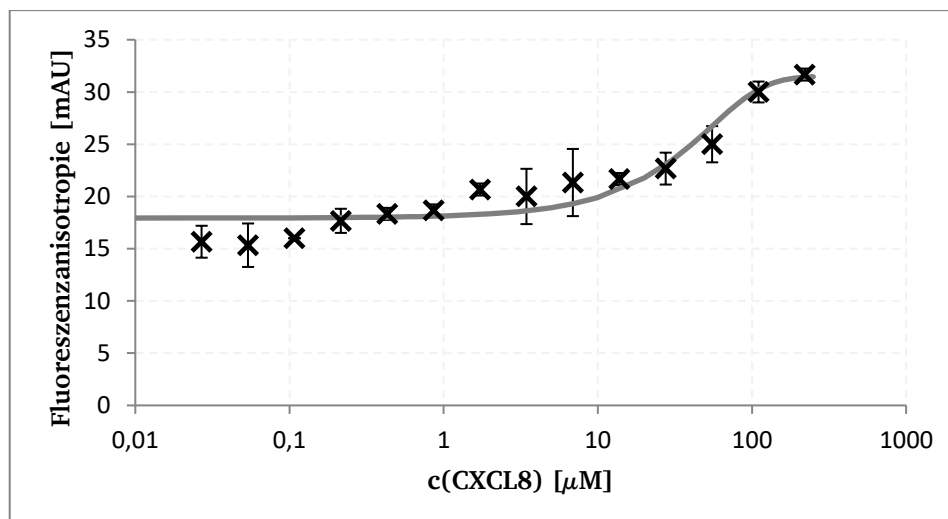


Abbildung 8.3: Bindungsisotherme von Peptomer Fluo-Att1NMet **17** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

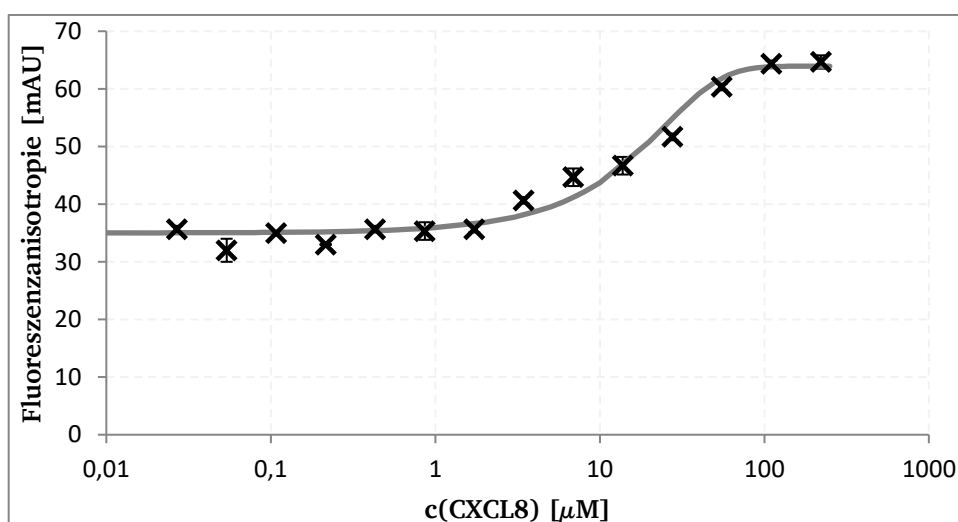


Abbildung 8.4: Bindungsisotherme von Peptomer Fluo-Att8NMet **18** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

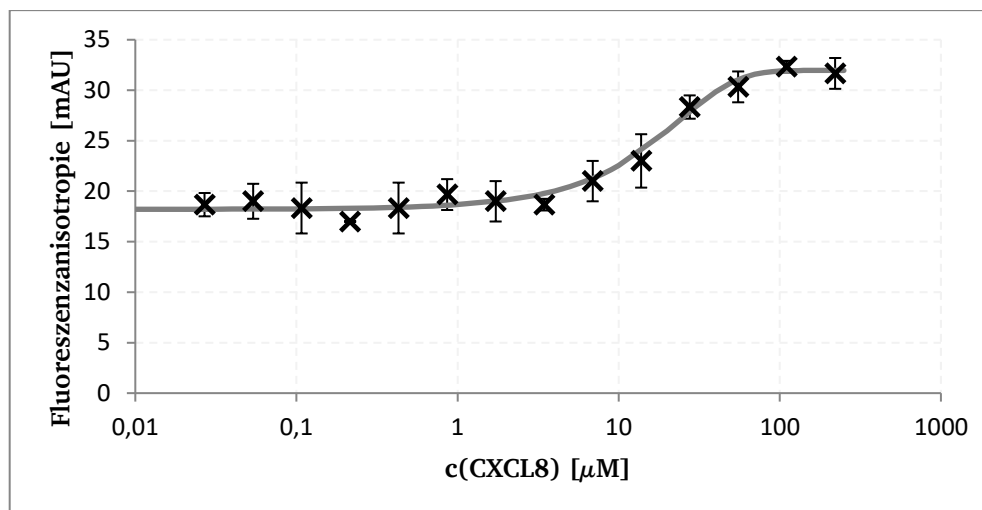


Abbildung 8.5: Bindungsisotherme von Peptomer Fluo-Att11NAla **19** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

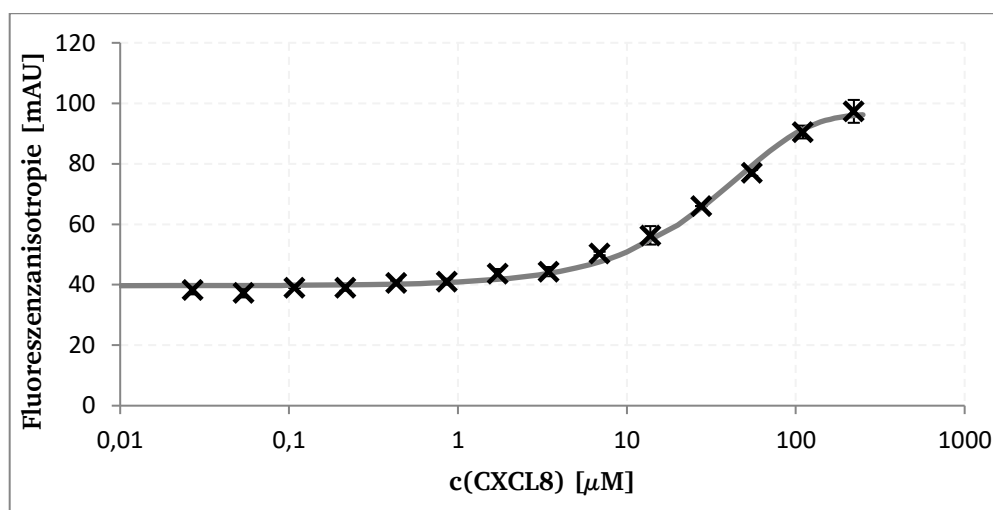


Abbildung 8.6: Bindungsisotherme von Peptomer Fluo-Att12NAsp **20** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

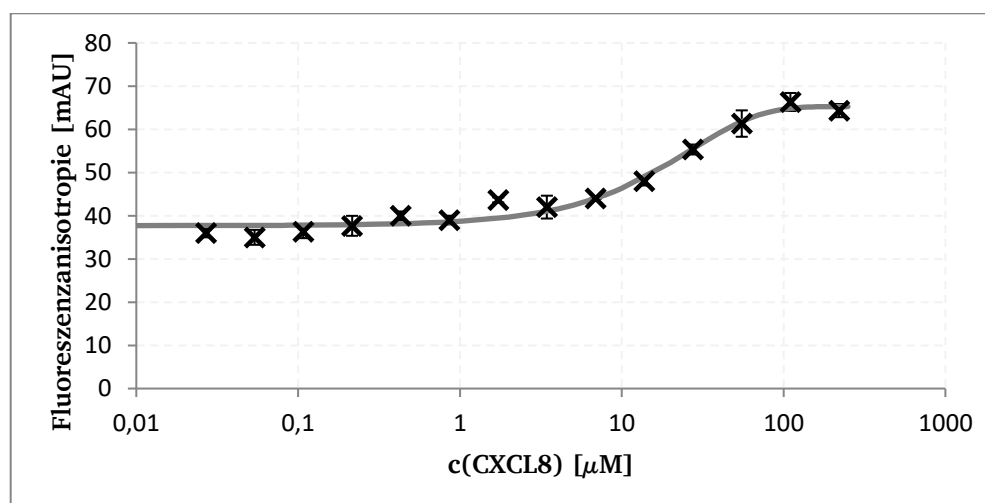


Abbildung 8.7: Bindungsisotherme von Peptomer Fluo-Att13NGlu **21** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

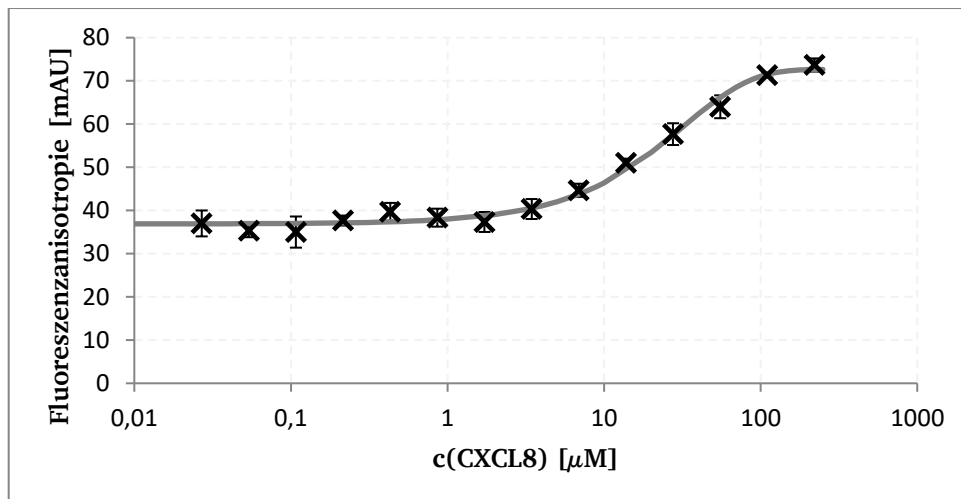


Abbildung 8.8: Bindungsisotherme von Peptomer Fluo-Att14NAsp **22** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

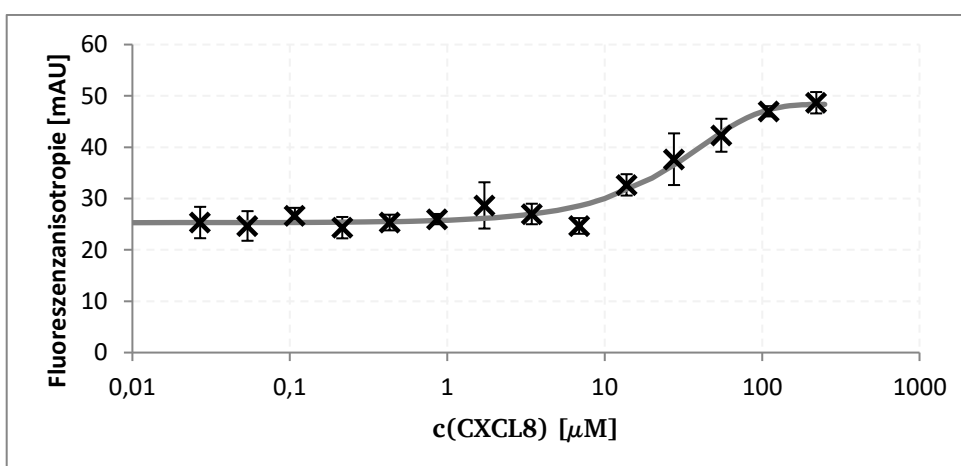


Abbildung 8.9: Bindungsisotherme von Peptomer Fluo-Att15NTyr **23** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.



### 8.3. Semiquantitative Bestimmung der Proteasestabilität zyklisierter Peptide

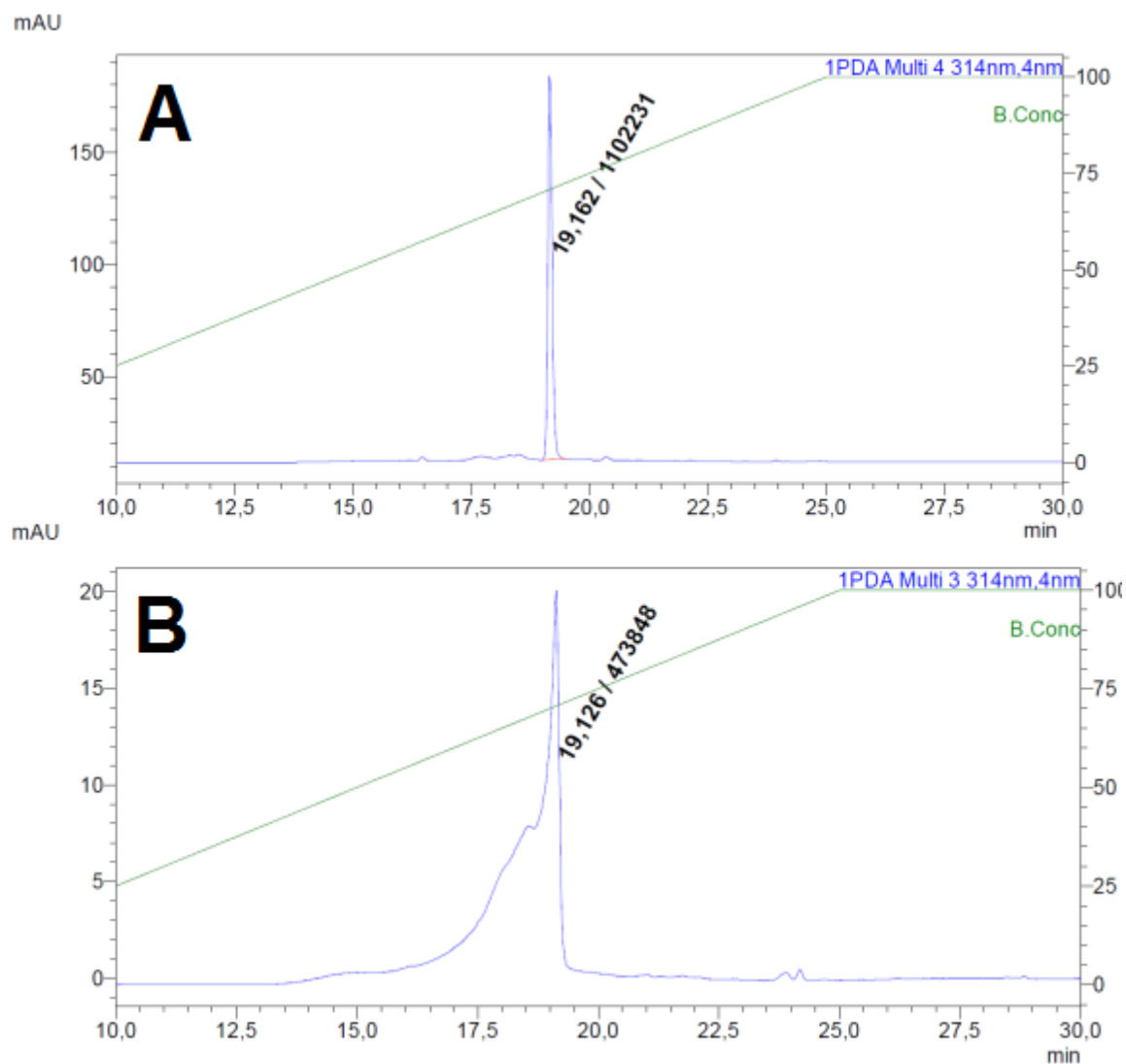


Abbildung 8.10: A: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von BAPNA vor Hydrolyse mit Trypsin.

B: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von BAPNA nach Hydrolyse mit Trypsin über Nacht bei Raumtemperatur.

Detektionswellenlänge 314 nm (blaue Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (grüne Linie). Integrierter Bereich (zwischen den roten Pfeilen).

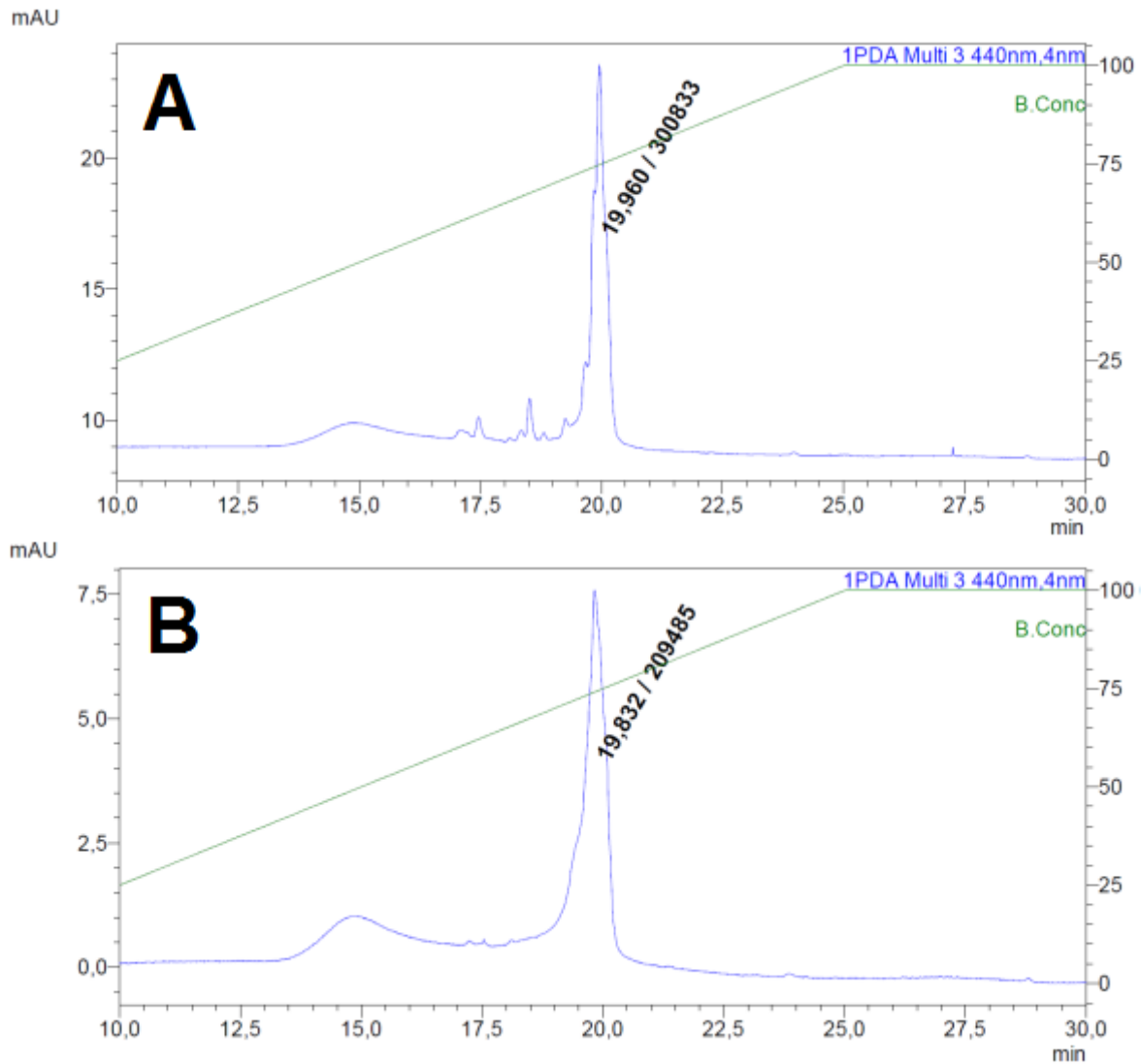


Abbildung 8.11: A: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem Fluo-IL8RP-LoopsQ **5** vor Hydrolyse mit Trypsin.

B: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von linearem Fluo-IL8RP-LoopsQ **5** nach Hydrolyse mit Trypsin.

Detektionswellenlänge 440 nm (blaue Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (grüne Linie). Integrierte Bereiche (zwischen den roten Pfeilen).

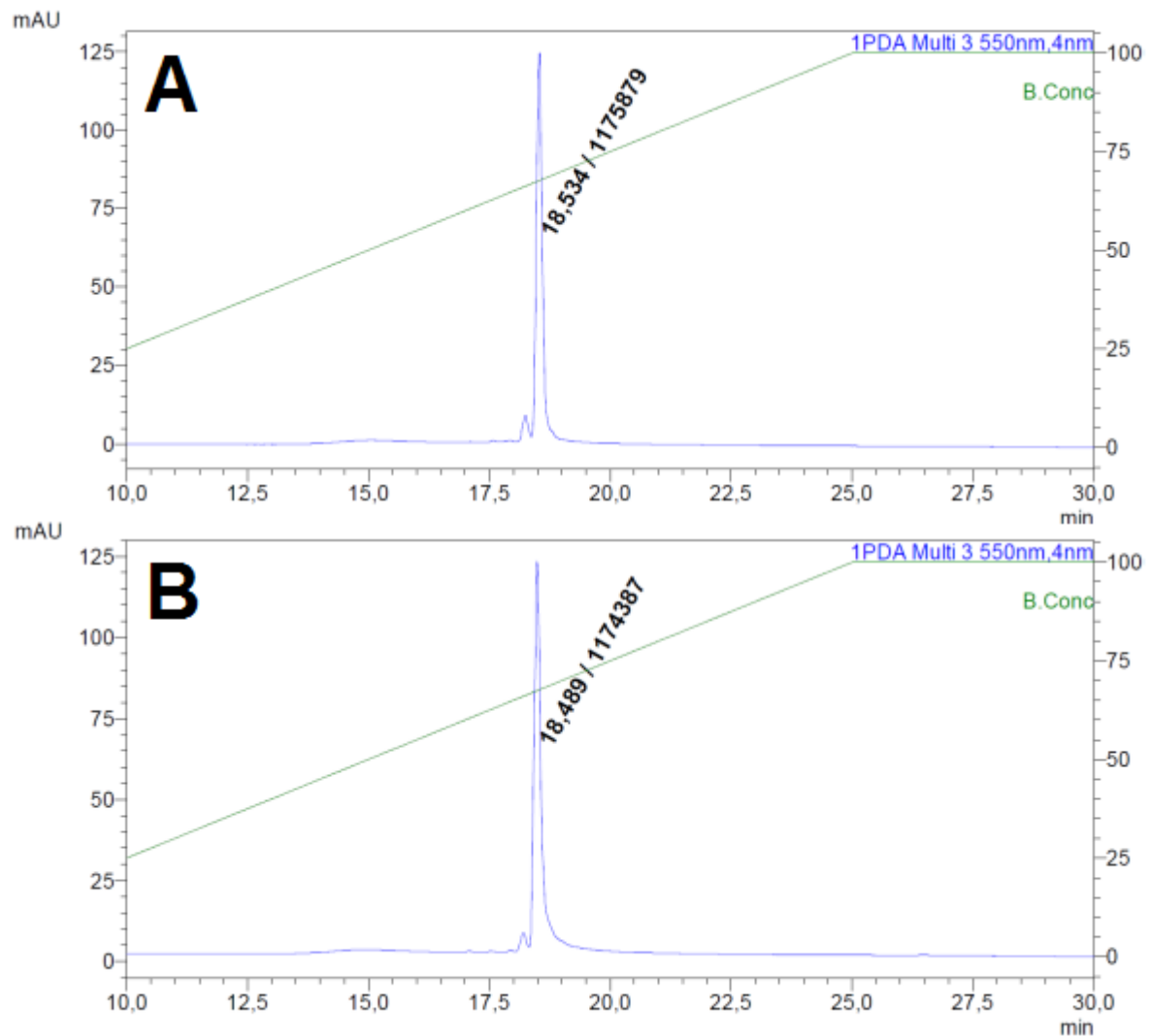


Abbildung 8.12: A: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von IL8-RPCycLoopsQ **25** vor Hydrolyse mit Trypsin. Detektionswellenlänge 550 nm.

B: Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm von IL8-RPCycLoopsQ **25** nach Hydrolyse mit Trypsin.

Detektionswellenlänge 440 nm (blaue Linie). Retentionszeit und relative Peakfläche sind angegeben. Konzentration von Eluent B (grüne Linie). Integrierte Bereiche (rote Pfeile).

#### 8.4. Bindungsaffinität zyklisierter Peptoide (vgl. Kapitel 4.4.2)

Zyklische Peptide **61-78** wurden durch Fluoreszenzanisotropiemessungen auf ihre Affinität zu CXCL8 untersucht.

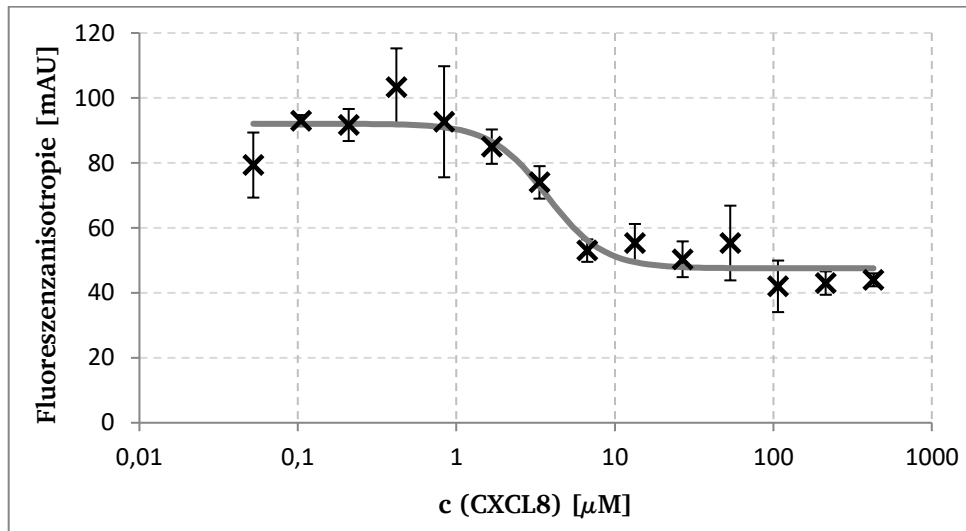


Abbildung 8.13: Bindungsisotherme von Peptoid **61** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

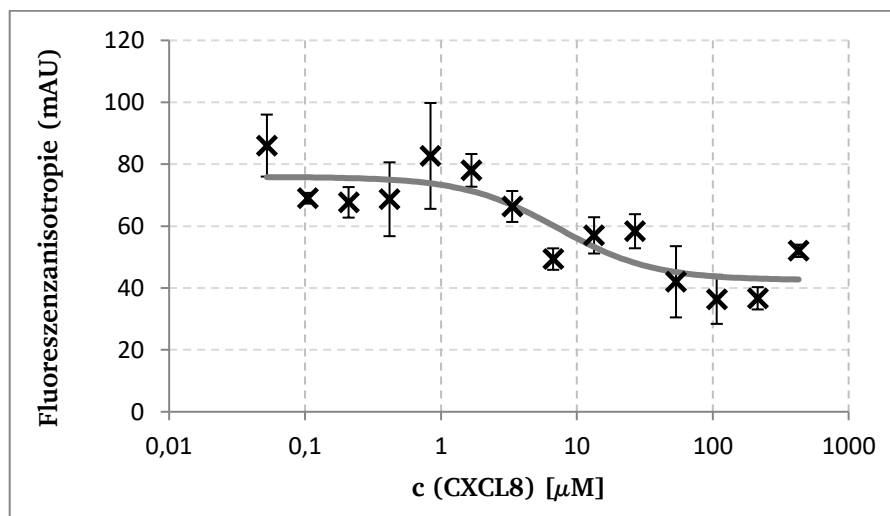


Abbildung 8.14: Bindungsisotherme von Peptoid **62** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

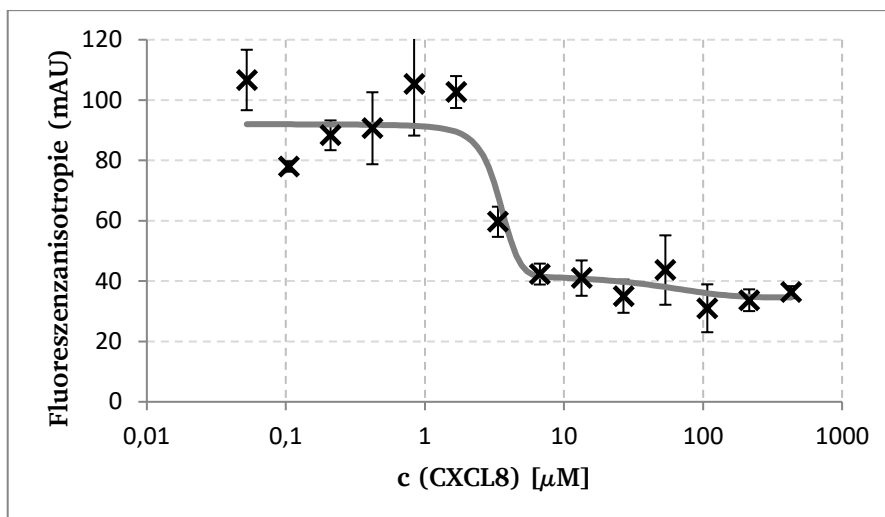


Abbildung 8.15: Bindungsisotherme von Peptoid **63** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

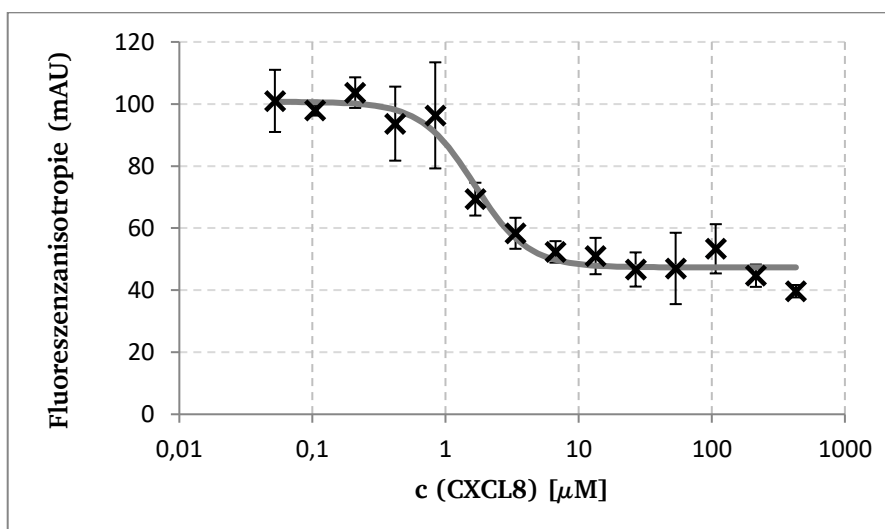


Abbildung 8.16: Bindungsisotherme von Peptoid **64** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

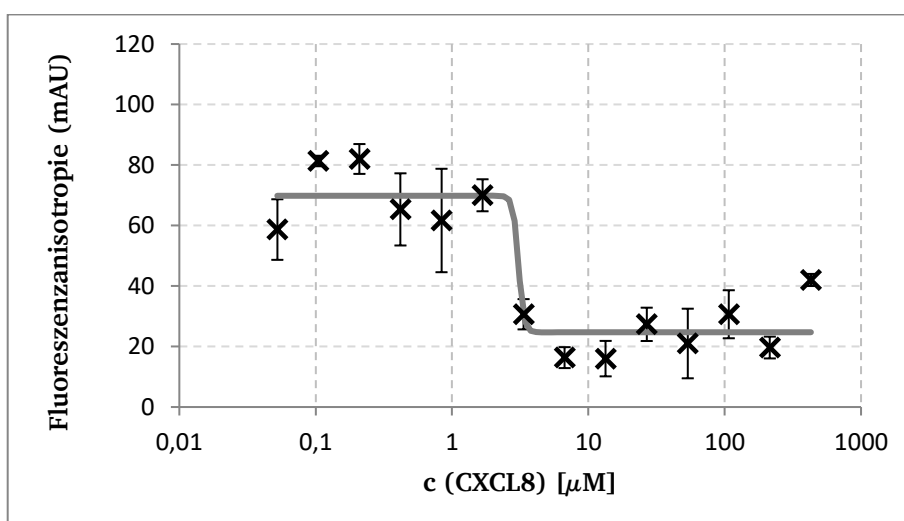


Abbildung 8.17: Bindungsisotherme von Peptoid **65** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

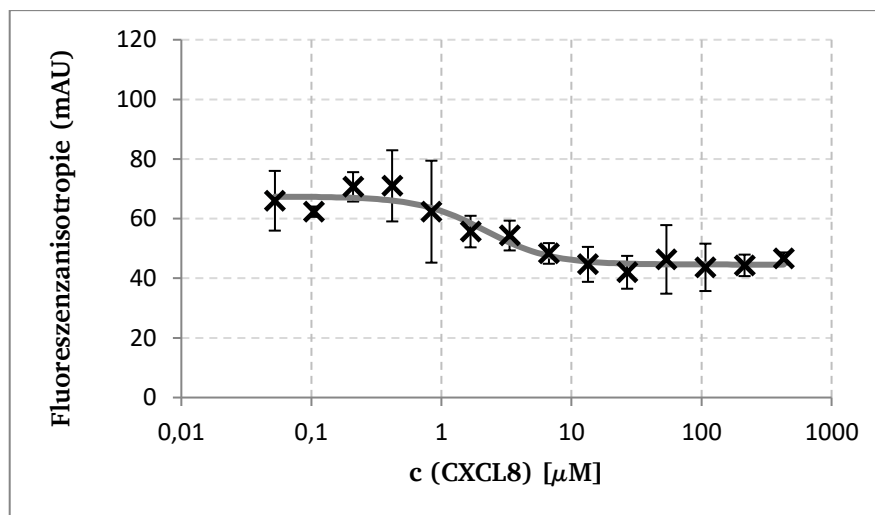


Abbildung 8.18: Bindungsisotherme von Peptoid **66** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

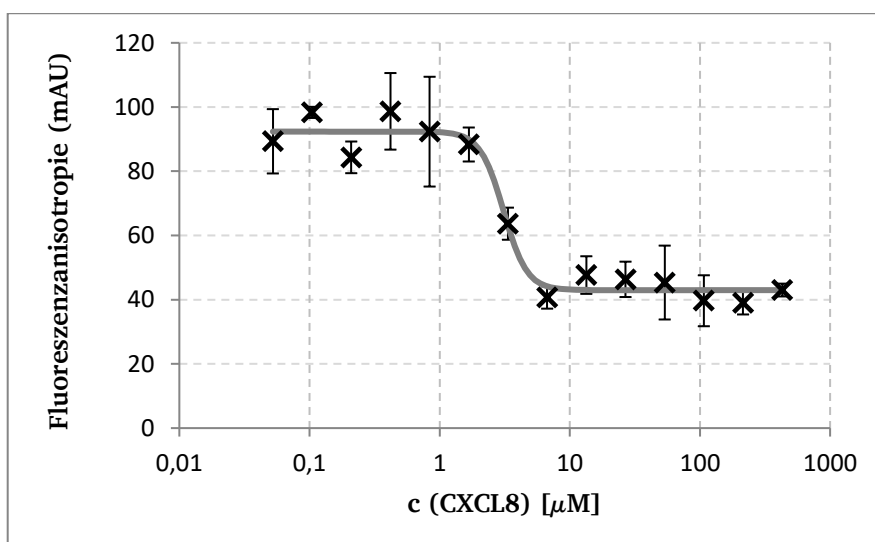


Abbildung 8.19: Bindungsisotherme von Peptoid **67** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

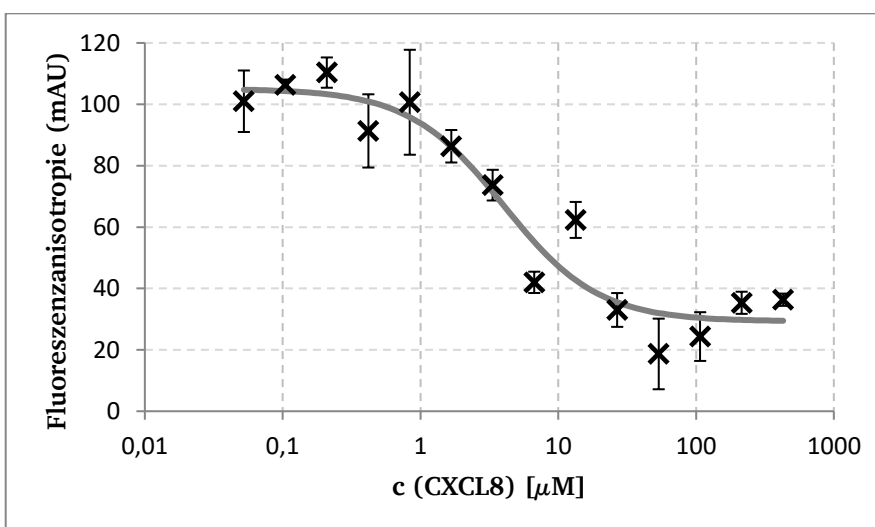


Abbildung 8.20: Bindungsisotherme von Peptoid **68** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

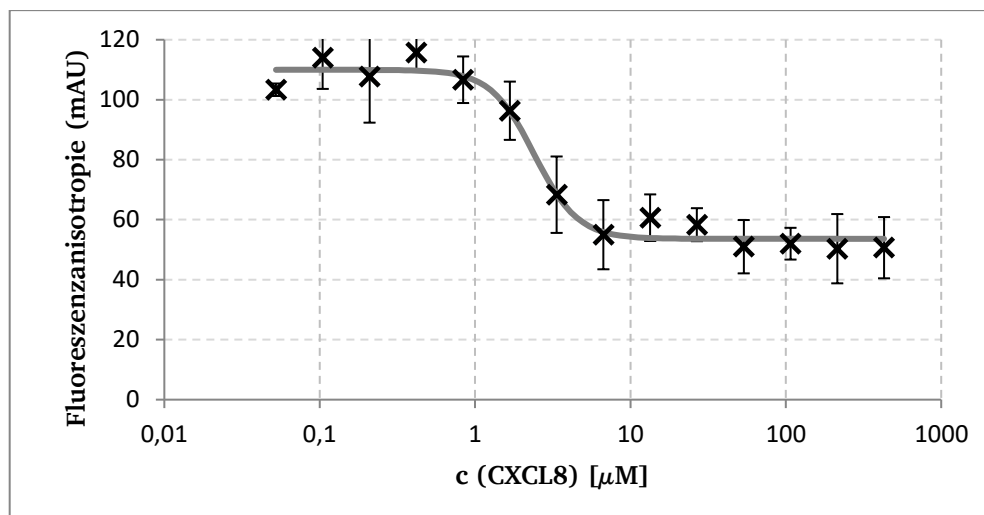


Abbildung 8.21: Bindungsisotherme von Peptoid **69** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

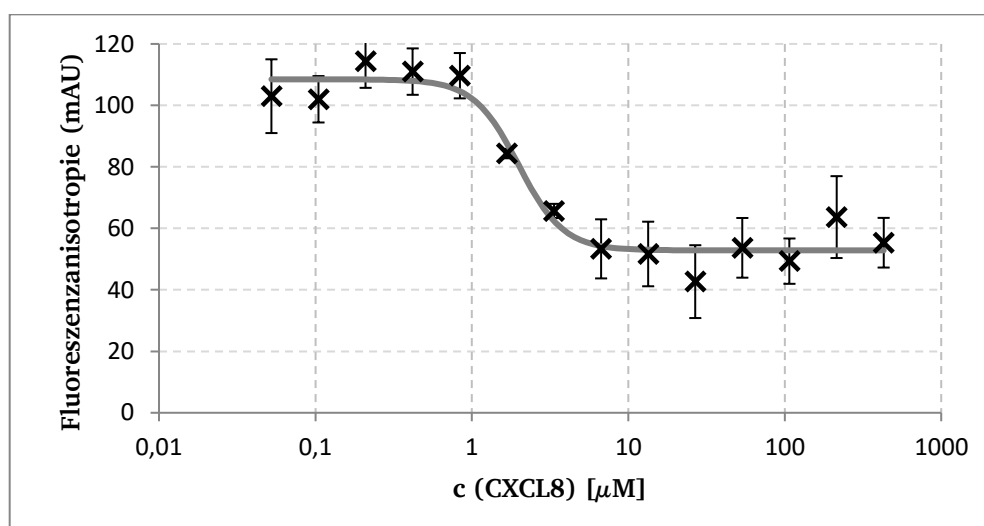


Abbildung 8.22: Bindungsisotherme von Peptoid **70** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

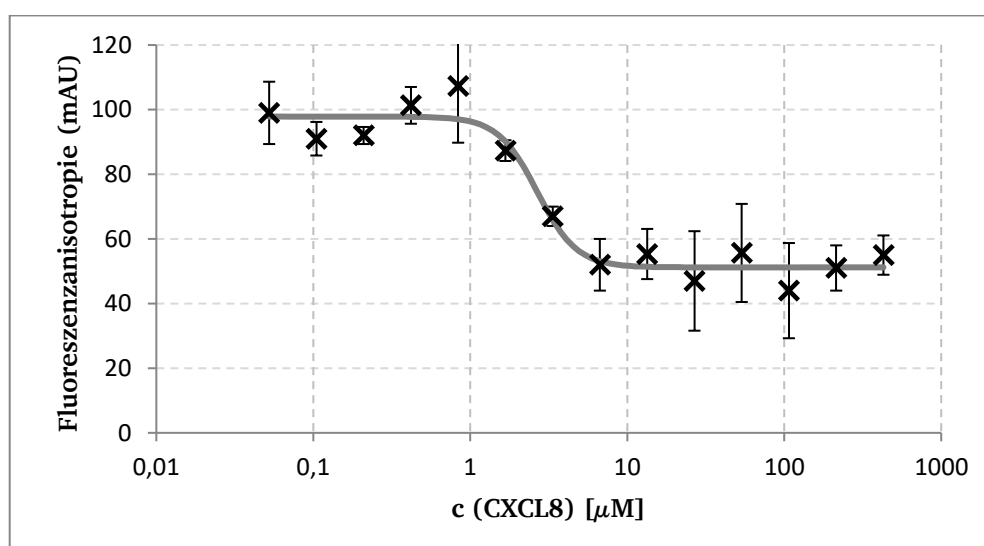


Abbildung 8.23: Bindungsisotherme von Peptoid **71** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.



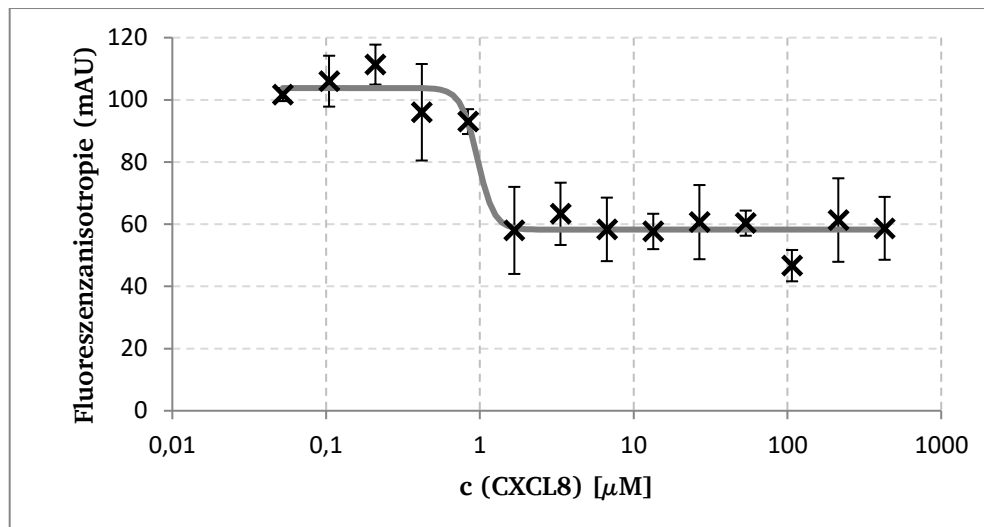


Abbildung 8.24: Bindungsisotherme von Peptoid **72** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

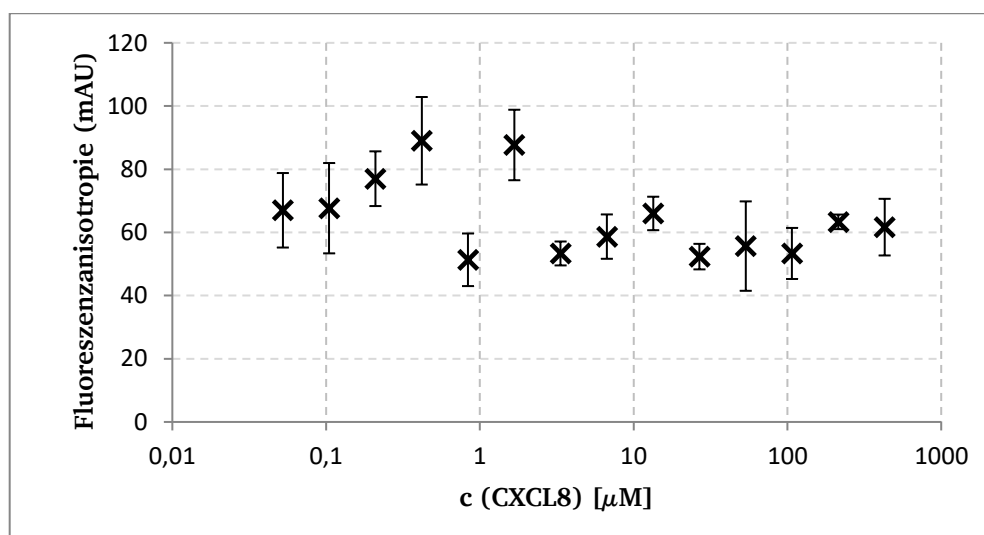


Abbildung 8.25: Bindungsisotherme von Peptoid **73** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

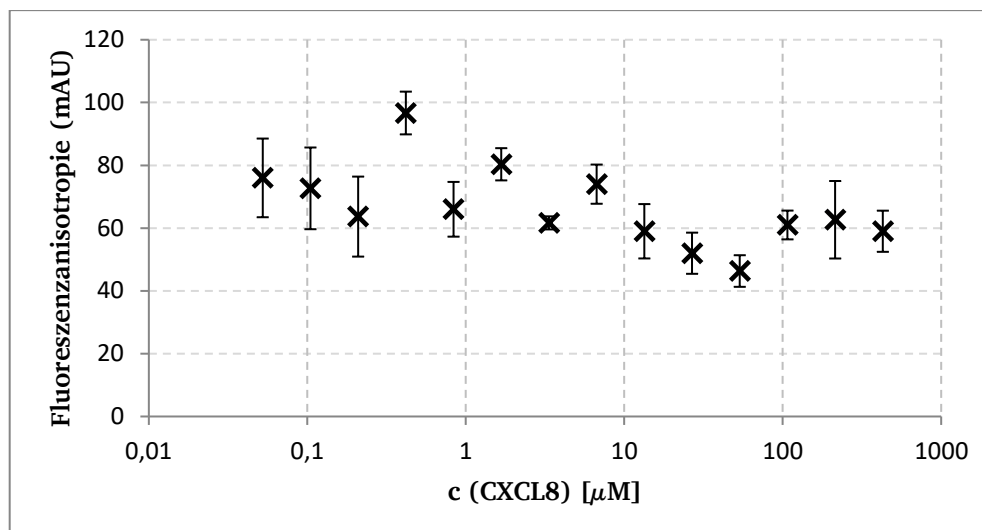


Abbildung 8.26: Bindungisotherme von Peptoid **74** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

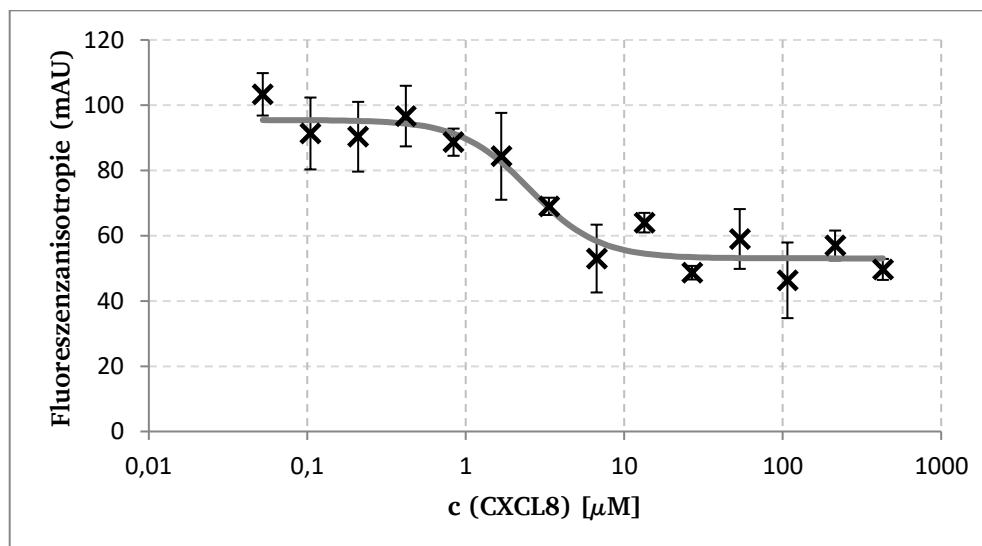


Abbildung 8.27: Bindungisotherme von Peptoid **75** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

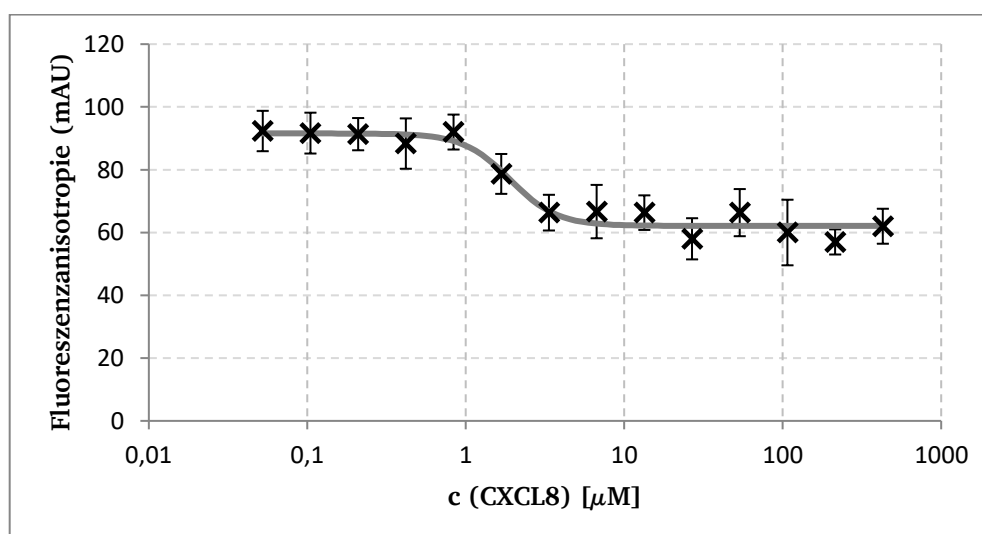


Abbildung 8.28: Bindungisotherme von Peptoid **76** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

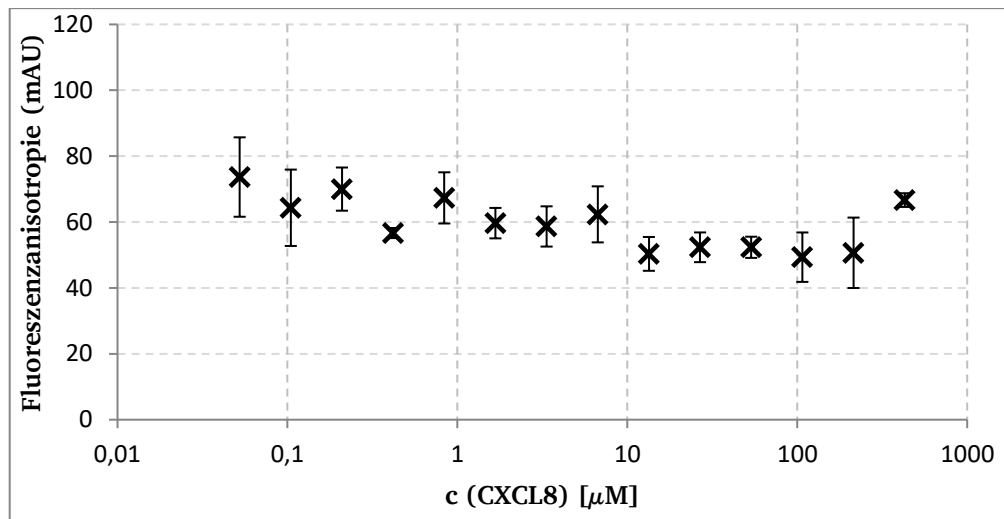


Abbildung 8.29: Bindungisotherme von Peptoid **77** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

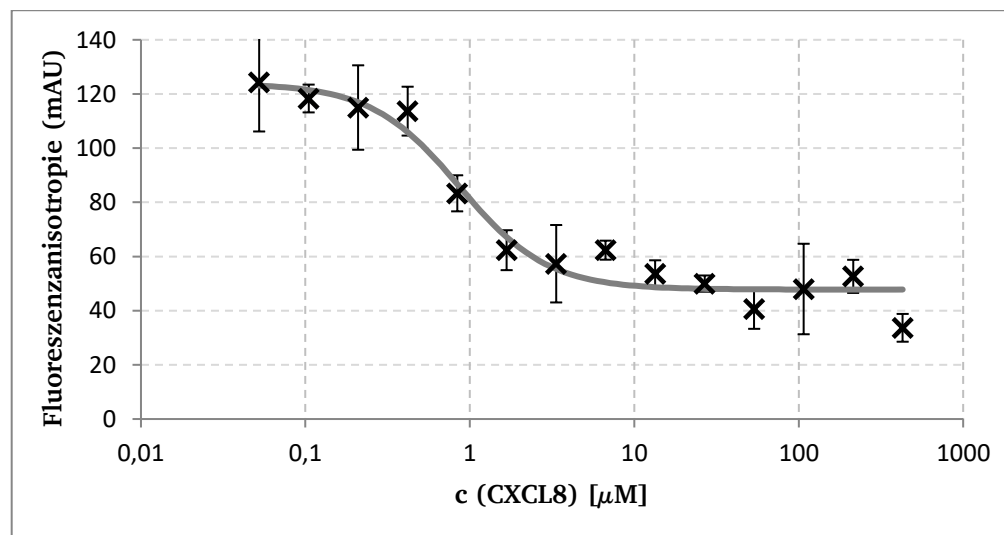


Abbildung 8.30: Bindungisotherme von Peptoid **78** mit CXCL8, bestimmt durch Fluoreszenzanisotropie.

## Abkürzungsverzeichnis

AcN	Acetonitril
äq.	Äquivalente
Ahx	Aminohexansäure
BAPNA	N-Benzoyl-D,L-Arginin-p-nitroanilid
BCA	Bicinchoninsäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BSA	Rinderserumalbumin
ClTrtCl	2-Chlorotritylchlorid-Linker
CV	Säulenvolumen
DAB	1,4-Diaminobutan
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d.Th.	der Theorie
DTT	Dithiothreitol
ECD	Extrazelluläre Domäne
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Electrospray Ionization
5(6)-FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FKS	Fötales Kälberserum
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMBA	4-(Hydroxymethyl)-benzoesäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IgG	Immunglobulin G
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
mAU	Milli-Absorbanz Einheit (Milli Absorbance Unit)
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MIP	Maleimidopropionsäure
M-PVA-C22	C <sub>22</sub> -COOH-funktionalisierte Polyvinylalkohol-Magnetpartikel
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether

n.b.	nicht bestimmbar
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
OtBu	<i>O</i> - <i>tert</i> -Butylester
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Fehleranfällige Polymerasekettenreaktion (error-prone-polymerase-chain-reaction)
PDA	Photo Diode Array
RMSD	Mittleres Abweichungsquadrat (root-mean-square deviation)
RMSF	Mittleres Abweichungsquadrat über die Zeit (root-mean-square fluctuation)
PyBOP	Bromo- <i>tris</i> -pyrrolidino phosphoniumhexafluorophosphat
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis (Festphasenpeptidsynthese)
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Tentagel
TIPS	Triisopropylsilan
TIPS-Cl	Triisopropylsilylchlorid
TMH	Transmembranhelix
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Trt	Trityl-Schutzgruppe

---

## Publikationen

- K. Brahm, J. S. Wack, S. Eckes, V. Engemann, K. Schmitz, „Macrocyclization enhances affinity of chemokine-binding peptoids”, *Biopolymers* **2019**, 110 (4).
- D. Helmer, K. Brahm, C. Helmer, J. S. Wack, G. Brenner-Weiss, K. Schmitz, „Two-channel image analysis method for the screening of OBOC libraries”, *RSC Analytical Methods* **2016**, 8, 4142-4152.
- D. Helmer, I. Rink, J. A. R. Dalton, K. Brahm, M. Jöst, T. M. Nargang, W. Blum, P. Wadhwani, G. Brenner-Weiss, B. E. Rapp, J. Giraldo, K. Schmitz, „Rational design of a peptide capture agent for CXCL8 based on a model of the CXCL8: CXCR1 complex“, *RSC Advances* **2015**, 5, 25657-25668.  
Correction in: *Rsc Adv* **2018**, 8, 16800 – 16801.

## Posterbeiträge

- K. Brahm, J. S. Wack, D. Helmer, K. Schmitz, „Translation of high affinity binding peptides to peptomer sequences and combinatory peptoid libraries in chemokine inhibitor screenings”, 9th Peptoid Summit, Berkeley **2015**
- K. Brahm, J. S. Wack, K. Schmitz, “Selection of protein ligands from large libraries with functionalized magnetic beads”, Bioorthogonal Chemistry, Berlin **2014**
- K. Brahm, J. S. Wack, K. Schmitz, “Selection of protein ligands from large libraries with functionalized magnetic beads”, Chemical Biology, Heidelberg **2014**
- M. Muschol, O. Ankudin, A. Atenhan, B. Becker, K. Brahm, M. Frenzel, M. Saager, E. R. Schäfer, H. Seelert, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz, N. A. Dencher, “Age-related changes in the mitochondrial lipidome as well as in the abundance, activity and supramolecular assembly of OxPhos enzymes”, Conference of Systems Biology of Mammalian Cells, Leipzig **2012**
- M. Muschol, A. Atenhan, K. Brahm, E. R. Schäfer, H. Seelert, N. A. Dencher, A. Hamann, A. Werner, H. D. Osiewacz, “Age-related changes in abundance, activity and supramolecular assembly of OxPhos enzymes in *Podospira anserina*”, Systems Biology of Human Disease, Heidelberg **2012**